

Universidad Autónoma de Madrid
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia.

**Alteraciones en la expresión de
transportadores de glutamato VGLUTs y
EAATs en la isquemia cerebral:
Implicación en procesos de neurogénesis
de la zona subventricular.**

Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica
Eduardo Sánchez Mendoza
para la obtención de la Tesis Doctoral
en el área de Neurociencias.

Madrid 2012

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, en colaboración con el Hospital La Fé de Valencia, bajo la dirección de la Profesora Dra. María Jesús Oset Gasque y la supervisión del Profesor Dr. Miguel Garzón, como tutor por el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Para Ademar y Beatriz.

*A la memoria de Enrique Weir y María Cristina
López.*

Agradecimientos

Quisiera agradecer a aquellas personas que han jugado un papel fundamental en la realización de esta tesis.

A Ademar y Beatriz. Ustedes son mi fuerza y mi inspiración.

A mi padre, quien siempre me mostró el valor del trabajo constante, y a mi madre, que me transmitió la importancia de saber ser minucioso.

A Amanda Urriola de Muro, mi querida profesora de Biología en Venezuela, quien sin saberlo dio inicio a este largo camino en 1996. No hay palabras en el mundo que describan lo importante que has sido para toda mi carrera. Siempre serás la marca de excelencia que persiga en todo lo que emprenda.

A mi perra Loky, que siempre me muestra desproporcionadamente lo fácil que es ser feliz con muy poco.

A mi directora de tesis, María Jesús Oset, quien ha tenido una paciencia interminable en la dirección de este trabajo y quien además me dio la nada común oportunidad de dejarme perseguir mis propias ideas.

A Carmen Arce, Pilar González y César Roncero, quienes en estos años me han ayudado a orientar mi trabajo, tanto en lo laboral como personal.

A Sabela Díaz-Castroverde. Si hubiera más estudiantes como tú España tendría un futuro científico brillante.

A Elvira López-Oliva, Ángel Agis, mis buenos amigos del Departamento de Fisiología, quienes sin tener nada que ver directamente con este trabajo, me han dado apoyo técnico e intelectual para llevar esto hasta el final.

Al personal del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad Complutense de Madrid entre los años 2007 y 2012. No hay uno que no haya aportado de alguna manera a este trabajo.

A María Calvo, Noemí Hernández, Claudia Schaffner, Kristian Koci. Mis queridos amigos que me ayudan a ver la parte divertida de lo trágico que es escribir una tesis.

Por último, pero no menos importante, quiero dar las gracias a Jorgina Satrústegui, Elena Escudero, Juan Bernal, Amelia Sánchez Capelo, Liset Menéndez de La Prida y Fabienne Agasse. Cada uno de ustedes puso un ladrillo importante en este camino, enseñándome pacientemente muchas técnicas que hemos utilizado en este trabajo. Buena parte de la orientación que hemos dado a esta investigación se fundamenta en las nociones que ustedes me dieron. Han sido un importante modelo a seguir.

Finalmente, en nombre de todas estas personas y de aquellas que ahora no vienen a mi mente, quiero tomar unas palabras que parecen ser atribuidas a Isaac Newton, PhD: Si he podido ver más lejos, es porque he estado a hombros de gigantes.

“Lo peor no es cometer un error, sino tratar de justificarlo, en vez de aprovecharlo como aviso providencial de nuestra ligereza e ignorancia”
Santiago Ramón y Cajal.

“To some extent, sanity is a form of conformity”
John Nash.

“This is the life we belong to, our gift divine”
John Petrucci.

Índice

I. Introducción	1
1. Fisiopatología de la isquemia cerebral	2
1.1 Introducción	2
1.2 Respuesta molecular en la isquemia	4
1.2.1 Excitotoxicidad	4
1.2.2 Tipos de muerte celular	5
1.2.3 Gliosis reactiva	5
2. Glutamato: Bioquímica e implicación en la isquemia cerebral	8
2.1 Importancia del glutamato como neurotransmisor	8
2.1.1 Receptores de glutamato	8
2.1.2 Transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs)	10
2.1.2.1 Mecanismo de acción	11
2.1.2.2 Distribución	12
2.1.2.3 ¿Qué papel juegan los VGLUTs en neuronas no glutamatérgicas?	14
2.1.3 Transportadores de membrana (EAATs)	15
2.2 Papel del glutamato en la isquemia cerebral	17
2.2.1 Alteraciones de aminoácidos neurotransmisores excitatorios e inhibitorios durante la isquemia cerebral	17
2.2.2 Alteración de los transportadores de glutamato en la isquemia cerebral	18
3. Neurogénesis de la zona subventricular (SVZ): Mecanismos moleculares y relación con el glutamato y la isquemia cerebral	20
3.1 Neurogénesis de la SVZ: Tipos celulares	20
3.2 Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la neurogénesis de la corriente migratoria rostral (RMS)	22
3.2.1 Regulación por Factores de crecimiento y señales extracelulares	22
3.2.2 Regulación por mecanismos intracelulares: Factores transcripcionales y receptores intracelulares	22
3.2.3 Papel de los neurotransmisores en la neurogénesis de la SVZ	23

3.3 Neurogénesis post-isquémica: Desplazamiento de las CPNs en migración hacia la corteza y estriado lesionados	25
3.3.1 Neurogénesis y neuroreparación en la isquemia cerebral	25
3.3.2 ¿Pueden los neurotransmisores participar en el proceso de neurogénesis subsiguiente a un ictus?	28
II. Objetivos	30
III. Materiales y métodos	32
1. Modelos animales de isquemia focal transitoria de la Arteria Cerebral Media (ACM)	33
1.1 Método del filamento intraluminal	33
1.1.1 Preparación de los animales	33
1.1.2 Método de isquemia	34
1.2 Método de ligadura de la ACM	34
1.2.1 Preparación de los animales	34
1.2.2 Método de isquemia	35
2. Cultivos celulares	36
2.1 Medios de cultivo	36
2.2 Cultivo de neuronas	36
2.3 Cultivo de astrocitos	36
2.4 Cultivo de células precursoras neurales (CPNs) de la SVZ	37
2.5 Isquemia experimental “in Vitro”: Modelo de privación de oxígeno y glucosa (POG)	37
3. Métodos empleados para la caracterización de la expresión de VGLUTs, EAATs y variables de neurogénesis	38
3.1 Preparación de las células para los distintos ensayos	38
3.1.1 Estudios de expresión y neurogénesis	38
3.1.2 Estudio del efecto de la exposición de neuroesferas a medios condicionados obtenidos en células sometidas a POG	39
3.1.3 Estudio del efecto de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato	39
3.2 Inmunodetecciones	40
3.2.1 Inmunohistoquímica para microscopía de	

fluorescencia y confocal	40
3.2.2 Inmunohistoquímica para microscopía electrónica	40
3.2.3 Inmunocitoquímica	41
3.2.3.1 Microscopios utilizados	42
3.3 Western Blot	42
3.3.1 Preparación de extractos y medida de proteínas	42
3.3.2 Western blot	44
3.4 Técnicas de RT-qPCR	45
3.4.1 Extracción de ARNm	45
3.4.2 Retrotranscripción (RT)	46
3.4.3 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)	46
3.4.4 Diseño de primers	47
3.5 Soluciones y tampones utilizados	49
3.6 Método estadístico y expresión de resultados	49
IV. Resultados	50
1. Estudio de la expresión de transportadores de glutamato vesiculares y de membrana en ratas isquémicas	51
1.1 Estudio de la expresión de VGLUTs y EAATs mediante inmunohistoquímica	51
1.1.1 Caracterización del proceso de isquemia focal transitoria (t-MCAO) por oclusión de la ACM mediante ligadura	51
1.1.2 El patrón de expresión de VGLUTs se altera por la t-MCAO en la corteza cerebral y en el caudado-putamen	51
1.2 Caracterización de la expresión de los transportadores vesiculares y de membrana de glutamato mediante Western-blot	54
1.1.3 Alteraciones en la expresión de VGLUTs en la corteza y caudado-putamen	54
1.1.4 Alteraciones en la expresión de EAATs en la corteza y caudado-putamen	56
1.1.5 Correlaciones entre los cambios observados en la expresión de VGLUTs y EAATs con el daño neurológico	58

1.3 Estudio de la expresión de VGLUTs y EAATs a nivel de ARNm, mediante RT-qPCR	60
1.3.1 Alteraciones en la expresión de ARNm de VGLUTs	60
1.3.2 Alteraciones en la expresión de ARNm de EAATs	62
1.3.3 Correlaciones entre las alteraciones en la expresión de ARNm de transportadores de glutamato y el deterioro neurológico	64
1.3.4 Inmunodetección de VGLUT1 en la corteza isquémica mediante microscopía electrónica	66
1.4 Caracterización de la expresión de VGLUTs en la glía reactiva	66
1.4.1 Los VGLUTs se expresan en la glía reactiva en el cuerpo calloso isquémico. Colocalización de VGLUTs y GFAP	66
1.4.2 Colocalización de VGLUTs y Glutamina Sintetasa	68
2. Implicación de las alteraciones de la expresión de VGLUTs y EAATs en el proceso de neurogénesis de la SVZ	70
2.1 Caracterización de la expresión de VGLUTs y EAATs en las células precursoras neurales de la SVZ	70
2.1.1 Morfología del cultivo de CPNs	70
2.1.2 Curso temporal de la expresión de VGLUTs y EAATs a nivel de ARNm en células precursoras neurales	71
2.1.3 Curso temporal de las variables de neurogénesis en CPNs	73
2.1.4 Expresión de los VGLUTs a nivel de proteína en células precursoras neurales	74
2.1.5 Análisis de la expresión de VGLUTs en distintos fenotipos celulares de las CPNs en cultivo mediante inmunodetección	75
2.2 Regulación de la expresión de VGLUTs en CPNs de la SVZ por distintos estímulos	82
2.2.1 Efecto del tratamiento con agonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato	82
2.2.2 Regulación de la expresión de los VGLUTs y EAATs por medios condicionados de neuronas y astrocitos sometidos a privación de oxígeno y glucosa (POG)	85

2.2.2.1 Regulación de la expresión de los VGLUTs y EAATs en CPNs por medios condicionados de neuronas sometidas a privación de oxígeno y glucosa (POG)	86
2.2.2.2 Regulación de la expresión de los VGLUTs y EAATs por medios condicionados de astrocitos sometidos a privación de oxígeno y glucosa (POG)	88
V. Análisis de resultados y discusión	91
1. Alteración en la expresión de transportadores de glutamato en la isquemia cerebral	92
1.1 La isquemia cerebral <i>in vivo</i> altera la expresión de VGLUTs	92
1.1.1 Significado funcional de la acumulación de proteína de VGLUT1	93
1.2 La isquemia cerebral altera la expresión de EAATs	94
1.2.1 Significado funcional de la reducción de la expresión de EAATs	95
1.4 Presencia de VGLUT2 y 3 en la glía reactiva del cuerpo calloso isquémico	96
2. Implicación de las alteraciones de la expresión de VGLUTs y EAATs en el proceso de neurogénesis de la SVZ	97
2.1 Caracterización de la expresión de VGLUTs y EAATs en CPNs	97
2.2 El glutamato puede inducir la expresión de VGLUTs y reprimir la de EAATs a través del receptor mGluR5	98
2.3 La isquemia <i>in vitro</i> altera el patrón de expresión de VGLUTs en las CPNs	99
2.3.1 ¿En qué tipo celular aumenta la expresión de VGLUTs por los estímulos estudiados?	101
2.3.2 ¿Sería posible que los VGLUTs constituyan una diana terapéutica en el tratamiento de la isquemia?	102
2.3.3 Propuesta de un modelo de participación de los VGLUTs en la neurogénesis de la SVZ tras la isquemia	102
VI. Conclusiones	106
VII. Bibliografía	109

I. Introducción

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad vascular cerebral o “ictus” es la causa más frecuente de enfermedad neurológica en los países desarrollados, representando la tercera causa de muerte en los países occidentales. En España es una de las causas de muerte más importantes en la mujer, y a su vez, un importante trastorno que origina situaciones de incapacidad grave y de demencia en el adulto.

En esta patología, el glutamato, sus diferentes tipos de receptores y transportadores, así como sus mecanismos de regulación y degradación, juegan un papel preponderante, puesto que en el momento del infarto la liberación masiva de este neurotransmisor induce un alto nivel de estrés metabólico que conduce a la muerte neuronal (Hossmann, 2006).

Dada la complejidad del tema que nos ocupa, y con el fin de exponerlo con la mayor claridad posible, en esta sección haremos en primer lugar una introducción a la fisiopatología de la isquemia cerebral. A continuación describiremos el papel del glutamato en el cerebro, sus mecanismos de acción y regulación y comentaremos en detalle el papel del glutamato en esta patología. Por último, y dado que en los últimos años se ha venido demostrando contundentemente la existencia de un proceso de neurogénesis en el cerebro adulto, examinaremos los mecanismos moleculares implicados en dicho proceso, su alteración durante la isquemia cerebral y la posible implicación del glutamato en el proceso de neurogénesis subsiguiente a la isquemia.

1. Fisiopatología de la isquemia cerebral

1.1 Introducción

Un ictus isquémico o infarto cerebral se produce como consecuencia de una obstrucción vascular que impide el acceso de sangre a una zona del cerebro. En este período las células del Sistema Nervioso Central (SNC) se ven privadas del aporte de oxígeno y glucosa proveniente de la sangre, lo que induce una serie de alteraciones metabólicas y electrofisiológicas como consecuencia de la interrupción de la glucólisis y el ciclo de Krebs. A diferencia de los astrocitos, que cuentan con una reserva de glucógeno que les permite resistir la ausencia de nutrientes obtenidos de la sangre, las neuronas dependen por completo del suplemento sanguíneo. Por lo tanto son las células más vulnerables al ictus (Ni, 1994; Allen et al., 2005; Hossmann, 2006).

Las alteraciones metabólicas que se dan en las neuronas dependen de la cantidad de sangre que llegue al tejido. Cuando el flujo disminuye por debajo de $0,55 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$ el primer proceso que se detiene es la síntesis de proteínas. Según va disminuyendo el flujo aumenta gradualmente el consumo de glucosa hasta alcanzar un máximo alrededor de $0,4\text{-}0,2 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$. En este punto se produce lactoacidosis como consecuencia de la detención del ciclo de Krebs. Por debajo de $0,2 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$ disminuye drásticamente la síntesis de ATP produciéndose un fallo energético. Como consecuencia el potencial de membrana asciende a aproximadamente -20mV por acumulación de K^+ intracelular y finalmente se produce la despolarización anóxica de las membranas y liberación masiva de neurotransmisores a la sinapsis (Allen et al.,

2005). En la Imagen 1 se puede apreciar cómo varían diferentes aspectos metabólicos como consecuencia de la disminución del flujo sanguíneo. Es importante resaltar que en el momento de la despolarización anóxica se liberan *diferentes* neurotransmisores como glutamato, GABA, adenosina o glicina, aunque, debido a su alta concentración, es el glutamato el que desencadenará la mayoría de los eventos moleculares que llevarán a la muerte celular.

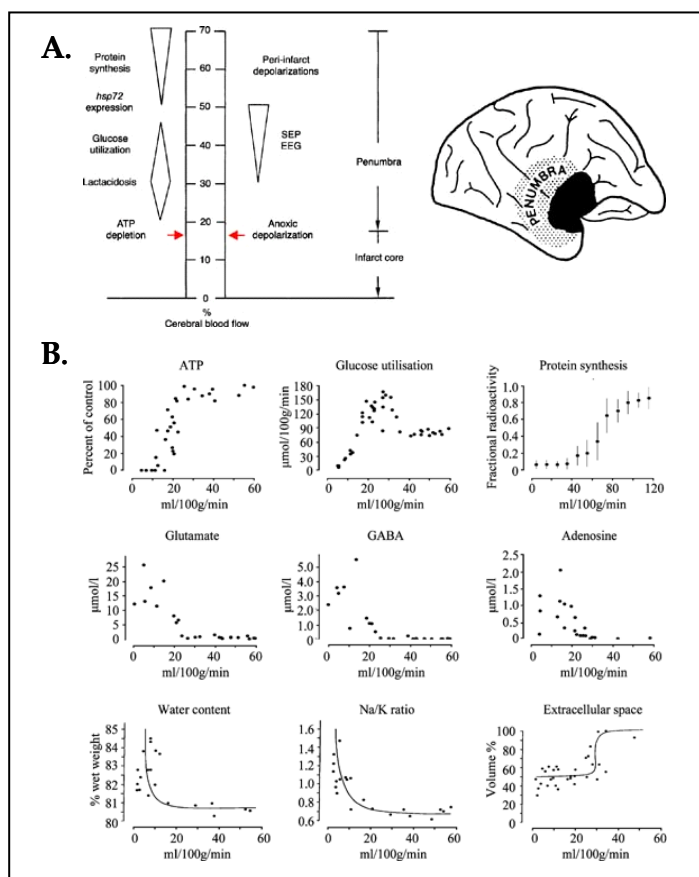


Imagen 1: Resumen de algunas de las alteraciones metabólicas y electrofisiológicas más importantes que ocurren durante la isquemia. A) Variaciones metabólicas y electrofisiológicas cuando se produce una disminución del flujo sanguíneo cortical. En el core hay una falta total de energía mientras que en la zona de penumbra se mantienen los umbrales mínimos. B) La disminución en el flujo sanguíneo y aporte de nutrientes colapsa el sistema energético evitando el reestablecimiento de la homeostasis celular, lo que lleva a la liberación masiva de neurotransmisores y la formación de edema. SEP: potenciales somáticos; EEG: electroencefalograma. (Modificado de Hossmann, 2006).

La actividad electrofisiológica también se ve afectada por la isquemia. La actividad evocada y espontánea se suprimen por debajo de alrededor de $0,18 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$ de flujo sanguíneo. Diferentes estudios neurológicos indican que la hemiparálisis transitoria aparece cuando el flujo alcanza $0,23 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$, mientras que la hemiparálisis permanente se da también alrededor de $0,18 \text{ mLg}^{-1}\text{min}^{-1}$. Es interesante notar que las alteraciones de la actividad eléctrica surgen por debajo del límite de la síntesis de proteínas, pero ocurren antes de que comience la crisis energética (Hossmann, 2006).

El bloqueo del flujo sanguíneo no es igual en toda el área afectada. Aquellas zonas en las que se desarrolle un fallo metabólico absoluto que produzca muerte celular constituirán el *núcleo* del infarto. En zonas más distales, en donde la microcirculación colateral ayude a mantener el flujo en un rango relativamente elevado, las células se mantendrán en un estado silente, pero estructuralmente intactas. Esta zona se conoce como *penumbra* (Hossmann, 2006). Esta distinción es importante

porque es la protección de la penumbra la que permitirá la reversión de la sintomatología del ictus agudo (Hossmann, 2006).

1.2 Respuesta molecular en la isquemia

1.2.1 Excitotoxicidad

Además del desequilibrio iónico derivado de la interrupción de la síntesis de ATP y la liberación masiva de neurotransmisores por despolarización anóxica, se activan los receptores de glutamato NMDA y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje provocando una elevación del Ca^{2+} citosólico. Esto conduce a una respuesta molecular conocida como **“Excitotoxicidad”** que puede llevar a la muerte celular (Imagen 2) (Castillo et al., 2003).

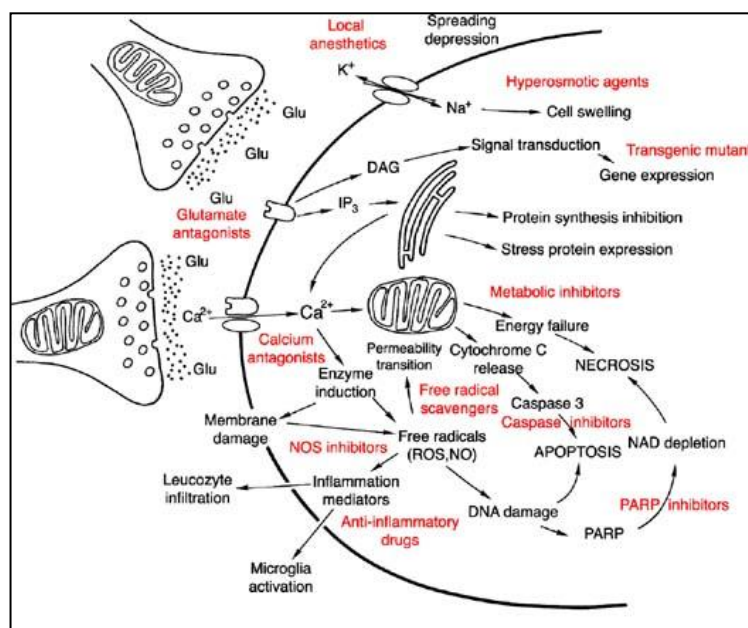


Imagen 2: Representación esquemática de los acontecimientos moleculares que conducen a la muerte celular durante la isquemia cerebral. Estas rutas de daño pueden ser bloqueadas a distintos niveles, proporcionando múltiples aproximaciones terapéuticas contra el daño celular necrótico y apoptótico inducido por la isquemia. (Modificado de Hossmann, 2006).

La elevación de la concentración de Ca^{2+} intracelular (Ca^{2+}_i) activa proteínquinasas, proteasas, endonucleasas, proteínfosfatasa y sintasa del óxido nítrico (NOS) y condiciona la expresión de varios genes de respuesta inmediata (Castillo et al., 2003). En la isquemia, la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede exceder la capacidad antioxidante de las neuronas, ocasionando alteraciones de algunos constituyentes celulares, como proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Hossmann, 2006). Las ROS, responsables del estrés oxidativo en las neuronas, son radicales libres como el anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) y el óxido nítrico (NO^{\bullet}) y otras especies tóxicas como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el peroxinitrito (ONOO^-). El NO^{\bullet} es un gas inorgánico que en situaciones fisiológicas actúa como un mensajero neuronal, pero que en la isquemia y otras patologías

desempeña un doble papel neurotóxico y neuroprotector. El aumento de la producción de NO• mediado por la acción de la óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) origina una lesión neuronal inmediata, mientras que el procedente de la NOS inducible (iNOS) contribuye al daño neuronal retardado; sin embargo, la producción de NO• mediada por la NOS endotelial actúa como neuroprotector, induciendo la relajación de la fibra muscular lisa y el mantenimiento del flujo sanguíneo cerebral (Castillo et al., 2003; Hossmann, 2006).

1.2.2 Tipos de muerte celular

En el núcleo de la lesión la muerte neuronal se da por necrosis, mientras que en la penumbra es el resultado de un proceso apoptótico (Hossmann, 2006). La lesión del ADN a través de las endonucleasas o de las ROS, inicia un complejo mecanismo autodestructivo en el que se implica una alteración de la expresión génica. Reducciones moderadas del ATP mitocondrial originan la liberación de caspasas, citocromo-c y del factor de inducción de la apoptosis (AIF), que actúan como iniciadores de la muerte neuronal apoptótica (Castillo et al., 2003; Hossmann, 2006). Por otra parte, existen evidencias recientes que demuestran la existencia de autofagia en la isquemia cerebral (Adhami et al., 2007), sugiriéndose que este proceso puede contribuir a la rápida degeneración de neuritas en la isquemia cerebral, ser desencadenado para eliminar mitocondrias dañadas y detener la apoptosis o para retrasar el comienzo de la necrosis mediante el mantenimiento de la homeostasis iónica a través de la producción de energía catabólica. Estas evidencias sugieren que necrosis, apoptosis y autofagia, conducen a la muerte neuronal en el proceso isquémico (Imagen 3).

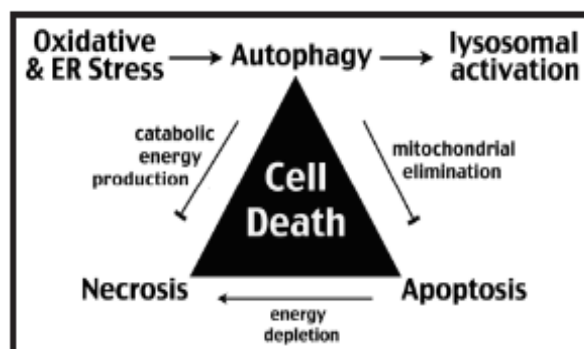


Imagen 3: La autofagia es un importante modificador de la muerte celular. El estrés oxidativo y del RE subsiguiente a la isquemia-hipoxia cerebral pueden inducir autofagia, la cual inicialmente previene la necrosis a través de la producción de energía catabólica y aborta la apoptosis vía eliminación del daño mitocondrial. Sin embargo, un alto nivel de “estrés autofágico” conduce a una activación lisosomal masiva y así a la muerte celular. Dependiendo de la relación entre necrosis, apoptosis y autofagia, las neuronas pueden mostrar características mezcladas de muerte celular en la isquemia, y presumiblemente en otros desórdenes neurológicos.

1.2.3 Gliosis reactiva y respuesta inflamatoria

Las células gliales cumplen varios roles importantísimos en el mantenimiento de la homeostasis del cerebro. En primer lugar filtran el paso de diferentes sustancias desde el torrente sanguíneo hacia el cerebro mediante su participación estructural en la barrera hematoencefálica. Un ejemplo importante aunque no muy conocido es la

regulación del paso de hormona tiroidea a través del transportador de monocarbolixatos MCT8 (Ceballos et al., 2009). Además pueden aportar energía metabólica a las neuronas generando lactato a partir de sus reservas de glucógeno en hipoxia (Sofroniew and Vinters, 2010), y pueden modular y potenciar la actividad sináptica mediante la liberación de gliotransmisores (por ejemplo glutamato o ATP) lo que ha llevado al planteamiento de la hipótesis de la sinapsis tripartita (Montana et al., 2004; Perea and Araque, 2007; Ni and Parpura, 2009; Perea et al., 2009; Sofroniew and Vinters, 2010).

Ante una lesión leve o severa, las células endoteliales vasculares principalmente, pero también las neuronas, astrocitos y microglia inician una respuesta inflamatoria por medio de la liberación de citoquinas. La interleucina-1 α (IL-1 α) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), son las dos citoquinas que inician la inflamación, cuya activación es muy precoz, pero transitoria. Posteriormente IL-6 e IL-8 inducen una segunda respuesta inflamatoria, mucho más persistente. Estas dos últimas desempeñan un importante papel en el desarrollo de reactantes de fase aguda, incluyendo la fiebre, la proteína C reactiva y el fibrinógeno, y en la liberación de un grupo de moléculas, genéricamente conocidas como adhesinas (selectinas, moléculas de adhesión intracelular (ICAMs) o vascular (VCAMs) e Integrinas, que originan la agregación leucocitaria y posteriormente su adherencia a elementos conjuntivos de la pared vascular (Castillo et al., 2003). Estos leucocitos, debido a la ruptura de la barrera hematoencefálica, invaden el tejido dañado, en un intento de recuperarlo, continuando la inflamación que ya se había iniciado. Debido al elevado número de leucocitos, se producirá la oclusión de algunos vasos, contribuyendo de nuevo al fenómeno del “no reflujo” que consiste en la oclusión de microvasos debido a la alta densidad de polimorfonucleares circulantes concentrados en ellos, eventos que van a agravar el daño por isquemia (revisado por (Lipton, 1999; Emerich et al., 2002). Por otro lado, en el endotelio vascular se producen especies reactivas con efectos vasoconstrictores, lo que va a contribuir a la reducción del calibre de determinados vasos. Estas especies reactivas, junto con el aumento de la permeabilidad vascular, etc., son otros factores responsables del daño cerebral mediado por la inflamación (para revisión ver Castillo et al., 2003).

Después del episodio isquémico, las células gliales sufren un proceso de hipertrofia y proliferación, conocido con el nombre de “gliosis reactiva”, que se ha relacionado con mecanismos de neuroprotección y reparación de la lesión isquémica (Lai and Todd, 2006). La reactividad glial es un proceso gradual continuo en el que el cambio morfológico va asociado a una serie de eventos moleculares que llevan en el caso más severo a la formación de la cicatriz glial. Esta consiste en la construcción de una barrera entre la zona lesionada y la sana formada por los astrocitos reactivos (Sofroniew and Vinters, 2010) que limita físicamente la dispersión de los restos celulares derivados de la muerte necrótica.

Durante la isquemia cerebral, el edema de los astrocitos es el primer cambio morfológico observado. El edema astrocítico está condicionado por el fallo energético que origina la despolarización de membrana y la apertura de varios canales iónicos, con la consiguiente entrada de Na⁺ y agua. El edema astrocítico es uno de los factores responsables de la disminución de la recaptación de glutamato ya que interfiere con la

direccionalidad del transporte por los EAATs (Rossi et al., 2000; Beart and O'Shea, 2007), promoviendo la excitotoxicidad (ver más adelante). Además de esto tanto neuronas, como astrocitos no reactivos, células endoteliales y microglia pueden contribuir a la reactividad astrocitaria mediante la liberación de factores como IL-1 α , TNF- α , factor neurotrófico ciliar (CNTF), INF γ , factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2), además de glutamato, ATP, ROS y NO; incluso la propia situación de hipoxia e hipoglucemia producida por la isquemia es de por sí un disparador de la reactividad glial (Sofroniew and Vinters, 2010).

La cicatriz glial puede tener efectos favorables o deletéreos en la recuperación de una lesión particularmente grave como es el ictus dependiendo del contexto en el que se encuentren las células. Durante una lesión aguda o en las proximidades al núcleo de la lesión, aquellas células que se encuentren en un área con un gran ambiente inflamatorio pueden contribuir al daño tisular mediante la sobre producción de ROS, liberación de glutamato por transporte reverso (ver más adelante) o promoviendo el daño tisular por una sobreproducción del factor de crecimiento vasculo-endotelial VEGF, además de impedir la reconstrucción de axones, lo que puede mantener a la corteza somatosensorial desconectada de las aferencias talámicas (Wang et al., 2007) retrasando la recuperación funcional. Por el contrario, en zonas donde la lesión no es tan grave, por ejemplo en la penumbra, la glía reactiva juega un papel fundamentalmente beneficioso en la recuperación tisular al estar implicada en recaptación de glutamato, protección de estrés oxidativo a través de la producción de glutatión o recuperación de la barrera hematoencefálica (Sofroniew and Vinters, 2010). Dichos efectos positivos pueden estar mediados por la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento neural (NGF), el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y VEGF que es capaz de aumentar la permeabilidad vascular (Beschoner et al., 2007). Por lo tanto el efecto positivo o negativo de la glía reactiva dependerá del balance total de las señales que éstas células reciban del ambiente en el que se encuentren (Sofroniew and Vinters, 2010).

El papel de la microglía durante la inflamación puede ser bivalente, y depende del estado y grado de resolución de la lesión isquémica. Durante las primeras horas y los primeros días, la microglía puede facilitar la muerte y la destrucción de las células nerviosas por la liberación de agentes como TNF- α , el monóxido de nitrógeno, el peróxido de hidrógeno y los aniones superóxido como la producción de citoquinas, NO \bullet y otros radicales libres; sin embargo, más tardíamente, la microglía puede fomentar la supervivencia de las células y la reparación de los tejidos por la síntesis de factores de crecimiento como las interleuquinas 1 y 3 y los factores de crecimiento celular, que estimulan la astrogliosis y la supervivencia neuronal (Lai and Todd, 2006).

2. Glutamato: Bioquímica e implicación en la isquemia cerebral

2.1 Importancia del glutamato como neurotransmisor

El glutamato es el principal neurotransmisor del SNC, actúa como mediador de la neurotransmisión rápida y está implicado en la transmisión de información sensorial, coordinación motora, emociones y conocimiento, incluyendo la formación y recuperación de la memoria. El 90% de las neuronas de las áreas del cerebro implicadas en procesos cognoscitivos, tales como la corteza y el hipocampo usan glutamato como neurotransmisor, siendo esta proporción de entre el 30 y 40 % en el conjunto del sistema nervioso. Diversas patologías como el ictus, la esquizofrenia, la enfermedad de Alzheimer o la esclerosis múltiple, están asociadas a alteraciones en el sistema glutamatérgico (Medina-Ceja et al., 2007).

En una sinapsis glutamatérgica canónica, las neuronas sintetizan este neurotransmisor de forma endógena principalmente a partir de glutamina a través de la enzima glutaminasa, o a partir de α -cetoglutarato (α -KG), en un proceso en el que intervienen las enzimas glutamato deshidrogenasa (GDH) y glutamato oxalacetato transaminasa (GOT). El glutamato se incorpora a las vesículas sinápticas a través de los transportadores vesiculares, VGLUTs, y posteriormente es liberado al medio extracelular. Tras ejercer su función en la transmisión nerviosa a través de una amplia variedad de receptores (ver siguiente apartado), los astrocitos absorben el exceso de glutamato del medio a través de los transportadores de membrana, EAATs, y lo reconvierten en glutamina mediante la enzima glutamina sintetasa (Ottersen OP et al., 1992) Finalmente la glutamina es reenviada a las neuronas, en donde se reinicia el proceso (Imagen 4).

El glutamato extracelular puede acumularse en el interior de los astrocitos tanto en el cerebro intacto (McLennan, 1976.) como en células en cultivo (Hertz et al., 1992), aunque una gran cantidad de glutamato se degrada como combustible metabólico a CO_2 y agua en los astrocitos, reduciendo de esta manera su conversión a glutamina (Hertz et al., 1992). Por ello existe una ruta alternativa mediante la que se obtienen las moléculas precursoras del glutamato o del GABA desde la glucosa. Dado que en los astrocitos tiene lugar la carboxilación del piruvato a oxalacetato, un intermediario del ciclo del ácido cítrico, la síntesis neta de α -cetoglutarato en el ciclo de Krebs también puede tener lugar en estas células.

2.1.1 Receptores de glutamato

Existen dos familias de receptores de glutamato: receptores ionotrópicos o iGluRs y receptores metabotrópicos o mGluRs.

A) Los **receptores ionotrópicos (iGluRs)** son canales de cationes cuya probabilidad de apertura se ve incrementada cuando el glutamato se une al receptor. Existen tres clases de receptores ionotrópicos de glutamato a los que se les dio nombre dependiendo del agonista que era más selectivo para cada uno de ellos: NMDA, AMPA y KA (Monaghan DT et al., 1989; Hollmann M and S., 1994; Hollmann and

Heinemann, 1994) Electrofisiológicamente, las respuestas inducidas por los receptores de NMDA se caracterizan por su relativamente lenta cinética respecto a los receptores no-NMDA y su alta permeabilidad al catión calcio (Wisden and Seeburg, 1993). Los receptores AMPA son principalmente permeables al Na^+ y están implicados en la respuesta rápida a de la neurotransmisión (generación de potenciales de acción). Los receptores NMDA son principalmente permeables al Ca^{2+} , permitiendo la activación de quinasas dependientes de calcio-calmodulina, la proteína quinasa C (PKC) o la PKA. Si bien la entrada masiva de Ca^{2+} puede inducir la formación de especies reactivas de oxígeno, la actividad de los receptores NMDA recientemente ha sido vinculada también a la reparación de los daños en el ADN precisamente a través de la inducción de expresión de enzimas reparadoras controladas por CREB (Yang et al., 2011).

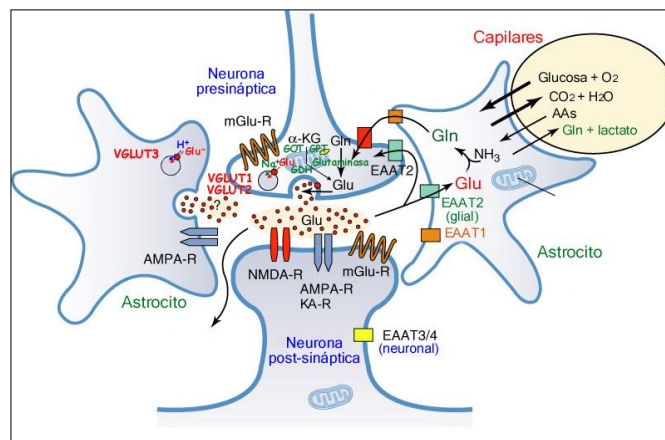


Imagen 4: Esquema de una sinapsis glutamatergica axodendrítica. Sinapsis glutamatergica axodendrítica que consiste en una terminación nerviosa presináptica y una dendrita post-sináptica. La terminación nerviosa contiene vesículas sinápticas con transportadores de glutamato (bolas rojas), mitocondrias (azul) con glutaminasa en las terminaciones nerviosas (bolas amarillas), mGluR, y transportadores para Glu (EAAT2) y glutamina (SA transporters). La espina dendrítica postsináptica contiene iGluR (AMPA y NMDA) y mGluR, y transportadores de Glu (EAAT3 y EAAT4 (el último en las células de Purkinje)). Rodeando la sinapsis están los astrocitos con transportadores para Glu (EAAT1 y EAAT2) y para glutamina (SN transporters), RGlut e incluso vesículas conteniendo Glu. Los rectángulos azules en la membrana plasmática del terminal axónico representan EAAT2 y en la de los astrocitos EAAT1/EAAT2. El glutamato se libera de las sinapsis sin transportadores alcanza las sinapsis vecinas. AMPA-R, AMPA receptors; EAAT1-4, excitatory amino acid transporters 1-4; Gln, glutamine; Glu, glutamate; mGlu-R, metabotropic glutamate receptors; SA and SN, system A and system N transporters respectively (for glutamine). Adaptado de (Hassel and Dingledine, 2006).

B) Los **receptores metabotrópicos (mGluRs)** activan enzimas intracelulares a través de proteínas G cuando unen glutamato, y se clasifican, a su vez, en tres clases (I, II y III) dependiendo de su mecanismo de transducción de señal, homología en la secuencia de aminoácidos y farmacología de agonistas. El grupo I incluye los receptores mGluR1 y 5, que están acoplados a proteínas Gq que activan la fosfolipasa C promoviendo la formación de diacilglicerol y 1,4,5-inositol trifosfato. Esto promueve la activación de PKC y activación de CREB y la liberación de Ca^{2+} de compartimentos intracelulares como la mitocondria (Nakamichi et al., 2009). Además de su función individual mGluR5 puede amplificar la potenciación a largo plazo (LTP) por su

interacción a nivel intracelular mediante proteínas scaffold con el receptor NMDA y puede formar dímeros y afectar la función de otros receptores como receptores de Ca^{2+} , adenosina, opioides y de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Bird and Lawrence, 2009). Como se verá más adelante tanto mGluR1 como el 5 se han implicado también en la neurogénesis, teniendo funciones complementarias (Castiglione et al., 2008). Los receptores de los grupos II (mGluR2 y 3) y III (mGluR 4, 5, 6, 7 y 8) están acoplados a proteínas G inhibitorias (Gi/o) que impiden la formación de cAMP interrumpiendo su función como segundo mensajero (Nakamichi et al., 2009).

2.1.2 Transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs).

En 1994 se determinó *in vitro* la existencia de una proteína que se sobreexpresaba en cultivos de neuronas cerebelares y que funcionaba como un transportador de fosfato dependiente de Na^+ , por lo que fue denominada BNP1 (brain-specific Na^+ -dependent inorganic phosphate transporter) (Ni, 1994). Curiosamente la inmunohistoquímica asociaba la proteína a vesículas sinápticas más que a la membrana plasmática (Bellocchio, 1998). Posteriormente evidencias obtenidas a partir del homólogo de BNP1, eat-4 de *Caenorabditis* (Takamori, 2006) indicó que BNP1 podría estar implicado en la incorporación de glutamato en vesículas sinápticas. Bellocchio y cols. (Bellocchio, 1998) determinaron que vesículas aisladas de cultivos que expresaran BNP1 podían incorporar glutamato si se establecía un gradiente electroquímico entre la vesícula y el medio. Por otro lado la expresión exógena de BNP1 confería un fenotipo glutamatérgico a neuronas GABAérgicas en cultivo (Takamori, 2006). Estas y otras evidencias, llevaron a renombrar a BNP1 como transportador vesicular de glutamato o VGLUT.

Hasta ahora se han caracterizado tres isoformas de estos transportadores que mantienen aproximadamente un 70% de homología en su estructura (Shigeri, 2004): VGLUT1, VGLUT2 y VGLUT3. Están conformados por 10 dominios transmembrana con los extremos N y C terminales dispuestos intracelularmente (Imagen 4). A pesar de su similitud estructural poseen diferentes afinidades por el glutamato. Así, VGLUT3 tiene la mayor afinidad por glutamato con una K_m de 0,56 mM, mientras que la de VGLUT1 es 3,4 mM y la de VGLUT2 1,9 mM (Herzog et al., 2004; Ni and Parpura, 2009).

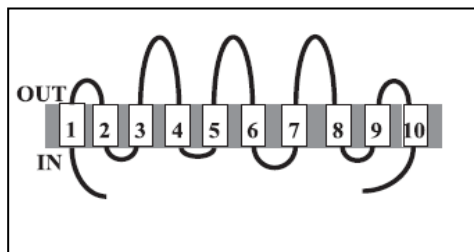


Imagen 5: Organización de los dominios transmembrana de los transportadores VGLUTs.

Los VGLUTs pertenecen a la familia de transportadores de neurotransmisores SLC17 (Imagen 5). Esta familia está implicada en el transporte vesicular de neurotransmisores aniónicos tales como glutamato y aspartato y contiene 9 miembros: los VGLUTs (1-3), el transportador vesicular de aminoácidos excitatorios (VEAT), 4

transportadores de fosfato, Na^+ -dependientes (NPT1, NPT3, NPT4, y homólogo NPT), que transportan aniones orgánicos, no relacionados con la neurotransmisión, y que están implicados en la eliminación de xenobióticos tóxicos en el riñón y un último miembro, más reciente, denominado transportador vesicular de nucleótidos (VNUT), implicado en la neurotransmisión purinérgica. Aunque sus sustratos y localización son diferentes, las propiedades bioquímicas y estructurales de toda la familia de SLC17 son muy similares (Omote et al., 2011).

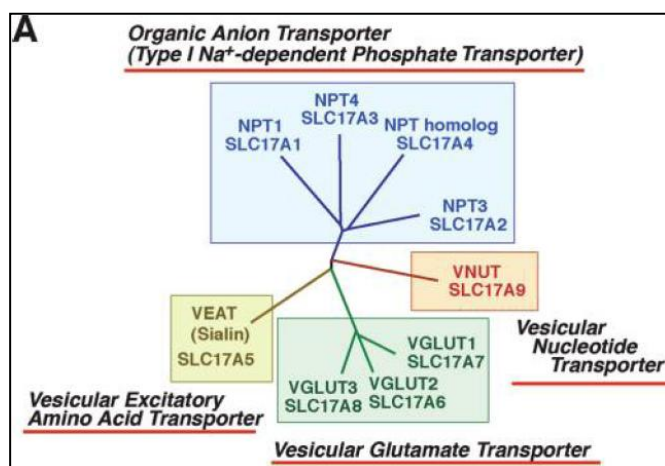


Imagen 6. Árbol filogenético de la familia de transportadores SLC17. Tomado de Omote et al. (2011).

2.1.2.1 Mecanismo de acción

El transporte de glutamato es dependiente de un gradiente electroquímico producido por una protón-ATPasa incorporada a la membrana vesicular. El gliceraldehído-3-fosfato es convertido a 1,3-bis-fosfoglicerato por la enzima GAPDH. Posteriormente el 1,3-bis-fosfoglicerato es desfosforilado suministrando el ATP que es utilizado por la protón-ATPasa. Una vez generado el gradiente el VGLUT transporta el glutamato al interior de la vesícula (Shigeri, 2004; El Mestikawy et al., 2011).

Los experimentos de inhibición de transporte de glutamato por los VGLUTs en vesículas aisladas han demostrado que la fuerza conductora primaria de este transporte es el potencial de membrana ($\Delta\psi$), a diferencia de otros transportadores vesiculares de monoaminas donde es el pH, aunque también se ha demostrado una fuerte dependencia del pH. Las afinidades, descritas anteriormente para el glutamato, entre 1 y 5 mM, son consistentes con las altas concentraciones citoplasmáticas de glutamato. Su especificidad de sustratos está estrictamente limitada al glutamato, no reconociendo ni aspartato ni glutamina (Omote et al., 2011).

Otra característica importante es su absoluto requerimiento de Cl^- y la dependencia bifásica de este anión (Imagen 6). A bajas concentraciones de Cl^- , el transporte de glutamato es minúsculo y se incrementa con la concentración, alcanzándose la máxima actividad a 4 mM; en cambio a altas concentraciones de Cl^- , su actividad transportadora decrece gradualmente. En las neuronas, la concentración de Cl^- se mantiene entre 0-30 mM por los transportadores KCC2 y NKCC, por lo que en

estas condiciones los VGLUTs son completamente activos. De forma interesante, se ha demostrado recientemente que la estimulación de los VGLUTs por Cl^- es inhibida competitivamente por cetoácidos intermediarios de la glucólisis y el metabolismo de los ácidos grasos, así como el piruvato y los cuerpos cetónicos como el 5-hidroxibutirato y el acetoacetato, lo que explica que una dieta cetogénica pueda ser utilizada con éxito en el control de la epilepsia, por disminuir la tasa de liberación de glutamato. Además de los cuerpos cetónicos muchos otros compuestos inhiben los VGLUTs, como aminoácidos, ácidos grasos, azo-colorantes, quinolinas y alcaloides. Al igual que el ácido kinurénico, los compuestos relacionados con quinolinas producidos en el metabolismo del triptófano, que inhiben el transporte vesicular de glutamato, es bien conocido que tienen actividad convulsivante/anticonvulsivante. También el ácido araquidónico y los ácidos grasos poliinsaturados inhiben el transporte vesicular de glutamato (Omote et al., 2011).

2.1.2.2 Distribución

Además de las diferentes propiedades cinéticas para los tres VGLUTs, otra diferencia muy importante entre las tres isoformas es la segregación en los sitios de síntesis y presencia predominante de los transportadores (Imagen 7). VGLUT1 es principalmente sintetizado en la corteza, giro dentado y capas CA1, 2 y 3 del hipocampo, algunos núcleos del tálamo y capa granular del cerebelo (Fujiyama et al., 2001; El Mestikawy et al., 2011). La proteína ocupa espacios muy definidos en las regiones donde se encuentra. Por ejemplo ocupa toda la corteza pero está especialmente concentrado en las capas I, II, III y V, mientras que en el hipocampo ocupa la capa molecular. También se encuentra difuminado en caudado-putamen y núcleos del tálamo (Fujiyama et al., 2001). VGLUT2, por el contrario, es principalmente sintetizado en el tálamo, hipotálamo y tronco cerebral y en menor medida en algunas zonas de la corteza parietal. Sin embargo, la proteína ocupa las capas IV y VI corticales principalmente, caudado-putamen, giro dentado, tálamo e hipotálamo (Fujiyama et al., 2001). Fujiyama y cols.(2001) han demostrado mediante inyección de ácido kaínico en el tálamo que el VGLUT2 detectado en la corteza por inmunohistoquímica procede de los núcleos ventroposteromedial y ventroposterolateral del tálamo. Es interesante notar la distribución complementaria de ambos transportadores en la corteza cerebral. Sin embargo, existen estudios que indican la coexpresión de ambos transportadores en algunas zonas, por ejemplo en el hipocampo, (Herzog, 2006) en los que se ha demostrado que pueden colocalizar no sólo en la misma neurona sino incluso en la misma terminal sináptica.

VGLUT3 representa el caso más curioso de los tres transportadores. Si bien es el transportador con más afinidad por glutamato es mucho menos abundante que los otros dos. Esta proteína es principalmente sintetizada en caudado-putamen, núcleo acumbens, globo pálido, capas CA3, CA2 y CA1 del hipocampo, giro dentado y plexo coroideo. La proteína puede observarse en somas de los ganglios basales y marcando axones y terminales nerviosas en corteza, septo lateral dorsal medio y ventral, sustancia negra compacta, área tegmental ventral, capas CA3, CA2 y CA1 del hipocampo y algunos somas en la capa molecular del hipocampo, núcleo interpeduncular, y diversos núcleos del tallo cerebral (Herzog et al., 2004). A diferencia de VGLUT 1 y 2, VGLUT3 es el único transportador que se distingue claramente en

somas neuronales, mientras que los otros dos marcan el neuropilo. La Imagen 8 muestra una representación de la distribución del ARNm de los transportadores en el cerebro en comparación con otros transportadores.

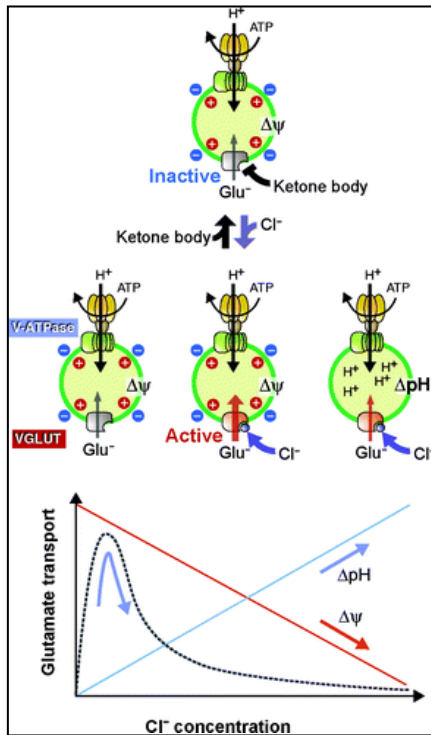


Imagen 7. Dependencia de Cl⁻ y regulación del transporte vesicular de glutamato. El Cl⁻ regula el transporte de glutamato controlando el gradiente de pH ($\Delta\mu H^+$) y la actividad de VGLUT. El incremento en las [Cl⁻] se incrementa el ΔpH y decrece el $\Delta\psi$. VGLUT exhibe un transporte bifásico de glutamato, dependiente de la [Cl⁻]. Bajas [Cl⁻] activan la actividad de VGLUT, mientras que altas lo inhiben debido a la pérdida de la fuerza conductora. Los cuerpos cetónicos inactivan el VGLUT mediante la inhibición de la unión de Cl⁻.

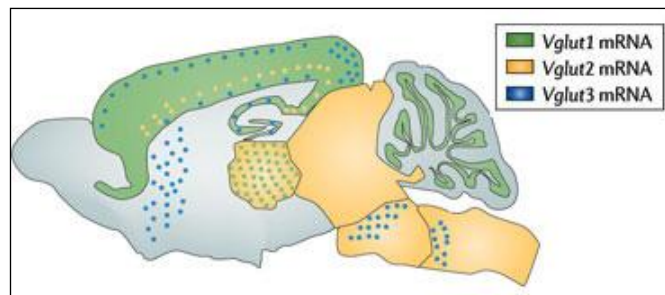


Imagen 8: Transportadores vesiculares de glutamato A) Los mRNAs para los VGLUT 1, 2, 3 se expresan en distintas poblaciones celulares en el cerebro. Experimentos de hibridación in situ para los 3 VGLUTs muestran que VGLUT1 (verde) se expresa en todas las capas de la corteza (Ctx), hipocampo (Hc) y giro dentado (Dg); VGLUT2 (amarillo) se expresa fundamentalmente en el tálamo, hipotálamo, tronco cerebral y capa IV de la corteza cerebral. VGLUT3 (azul) se expresa en la capa II y VI de la corteza. Las interneuronas hipocámpales también expresan VGLUT3, así como los astrocitos (no mostrado). Tomado de El Mestikawy et al. (2011).

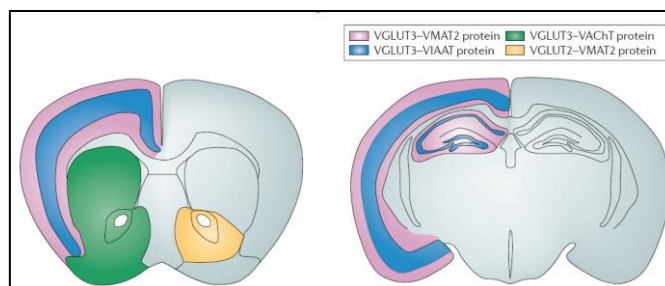


Imagen 9: Representación esquemática de secciones coronales de cerebro de rata de las secciones anatómicas en las que las proteínas de VGLUT2 o VGLUT3 se ha visto que están presentes en los terminales axónicos que contienen dopamina (amarillo), serotonina (rosa), acetilcolina (verde oscuro) o GABA (azul). Los transportadores vesiculares de monoaminas 2 (VMAT2), acetilcolina (VACHT) y aminoácidos inhibitorios (VIAAT) pueden usarse también para visualizar los terminales axónicos de dopamina y serotonina, acetilcolina y GABA, respectivamente. La sinergia vesicular puede ocurrir teóricamente en todas las áreas del cerebro indicadas. Tomado de El Mestikawy (2011).

Sorprendentemente, estos transportadores no sólo están asociados a terminales glutamatérgicos. Muchos estudios han asociado los VGLUTs a neuronas no glutamatérgicas en donde el glutamato podría jugar un papel modulador de la actividad del otro neurotransmisor al que estén asociados (Herzog, 2006). Así pues VGLUT1 puede asociarse a terminales colinérgicas en el núcleo interpeduncular y gabaérgicas en la corteza, corteza cerebelar, retina e hipocampo. VGLUT2 está presente en terminales de neuronas colinérgicas en la médula espinal y gabaérgicas en el hipocampo. VGLUT3 está presente en terminales serotoninérgicas en corteza, hipocampo, bulbo olfatorio amígdala, área tegmental ventral, plexo supraependimal y médula espinal; está asociado a terminales colinérgicas en el estriado y la amígdala y a terminales gabaérgicas en la corteza, hipocampo, células de Purkinje y oliva superior. La variedad de terminales en las que podemos encontrar estos transportadores resalta una vez más la importancia del glutamato en la función del SNC (El Mestikawy et al., 2011).

2.1.2.3 ¿Qué función juegan los VGLUTs en las neuronas no glutamatérgicas?

Dados los requerimientos electroquímicos de los diferentes transportadores de neurotransmisores se piensa que la presencia de VGLUTs en las mismas vesículas en las que se encuentran otros transportadores puede favorecer la incorporación de otro neurotransmisor y en último término actuar como un potenciador de la actividad sináptica; este proceso se conoce como sinergia vesicular (El Mestikawy et al., 2011). Dado que la incorporación de glutamato por los VGLUTs supone el incremento de $\Delta\mu\text{H}^+$, la incorporación de acetilcolina o serotonina se ve favorecida puesto que sus transportadores VACHT o VMAT expulsan 2H^+ por cada molécula de acetilcolina o serotonina incorporada a la vesícula. Además, la co-liberación de glutamato junto a otros neurotransmisores podría modular la actividad de dichas sinapsis. Por ejemplo, la estimulación de neuronas emergentes de los núcleos de Raphe puede promover la activación de respuestas dependientes de AMPA, mientras que el tratamiento con inhibidores de los receptores

ionotrópicos de serotonina 5-HT₃ induce una reducción parcial de la respuesta sináptica rápida (El Mestikawy et al., 2011).

2.1.2.4 Relación con patologías

Algunos estudios indican que el nivel de expresión de los VGLUTs puede alterarse en determinadas patologías. Por ejemplo, las drogas antidepresivas inducen un incremento de VGLUT1 en corteza e hipocampo, mientras que en pacientes esquizofrénicos VGLUT1 disminuye en la corteza y la expresión de VGLUT2 aumenta en el tálamo (Takamori, 2006). También se ha detectado un incremento de VGLUT1 y 2 en muestras humanas de la enfermedad de Parkinson (Kashani et al., 2007). Estas alteraciones en los niveles de expresión de los VGLUTs no son triviales, ya que diferentes estudios *in vitro* indican que un incremento en la cantidad de transportadores presentes en las vesículas sinápticas se relacionan directamente con un incremento de la cantidad de glutamato liberada al medio (Wilson et al., 2005). En ratones KO para VGLUT2 los heterocigotos presentan alteraciones en conductas como la respuesta al dolor o el ocultamiento de bolos de comida. Estos cambios conductuales se relacionan con una disminución en la amplitud de la respuesta postsináptica (potenciales postsinápticos en miniatura; mEPSP) en cultivos de neuronas talámicas (Moechars, 2006). Además, la sobreexpresión del homólogo de *Drosophila* de VGLUT1, D-VGLUT1, mediante vectores virales, genera una alta tasa de mortalidad neuronal en estas moscas (Daniels et al., 2011). En concordancia con estos datos se ha observado que la reducción en la expresión de VGLUT2 en la médula espinal en un modelo de esclerosis lateral amiotrófica aumenta la viabilidad neuronal en esta zona y la supervivencia de los animales (Wootz et al., 2010).

2.1.3 Transportadores de membrana (EAATs)

Los transportadores de membrana plasmática EAATs (Excitatory Aminoacid Transporters) tienen como función la reincorporación del glutamato presente en el espacio sináptico al interior celular (Imagen 3). Hasta ahora se han caracterizado cinco isoformas (2007). EAAT1 (homólogo del transportador humano de L-glutamato/L-aspartato (GLAST) y EAAT2 (homólogo del transportador de glutamato humano tipo 1 GLT-1) están presentes en células gliales en el cerebro y cerebelo. EAAT1 es el transportador predominante en la glía de Bergmann, mientras que EAAT2 es predominante en el resto del SNC (Beart and O'Shea, 2007). EAAT3 (homólogo del transportador humano EAAC1) y EAAT4 están presentes en neuronas. EAAT3 está disperso por todo el SNC, pero se concentra especialmente en las células piramidales de la capa IV de la corteza, así como en las capas CA1, 2 y 3 del hipocampo (Gottlieb et al., 2000) mientras que EAAT4 se concentra en células de Purkinje. Por último EAAT5 está presente en las células bipolares de la retina (Beart and O'Shea, 2007). Finalmente, algunos grupos han descrito la existencia de un variante de splicing de EAAT2, que han llamado EAAT2b, aparentemente asociado a neuronas presinápticas (Tzingounis and Wadiche, 2007).

De acuerdo con datos biofísicos, los EAATs funcionan como trímeros de subunidades idénticas (Imagen 9A) las cuales pueden funcionar de forma independiente entre sí (Beart and O'Shea, 2007). Actualmente se piensa que los EAATs cotransportan 3Na⁺ por cada glutamato incorporado al interior celular mientras

exportan $1K^+$ por cada ciclo de transporte (Imagen 9B). Este proceso es exclusivamente dependiente del gradiente de concentración de los iones implicados a ambos lados de la membrana (Tzingounis and Wadiche, 2007), por lo tanto esta característica jugará un papel muy importante en la acumulación de glutamato extracelular durante la isquemia (ver más adelante). Además, hay varios trabajos que indican que los EAATs también pueden funcionar como canales para Cl^- y que la conductancia para este ión es independiente del transporte de glutamato (Beart and O'Shea, 2007).

A.

B.

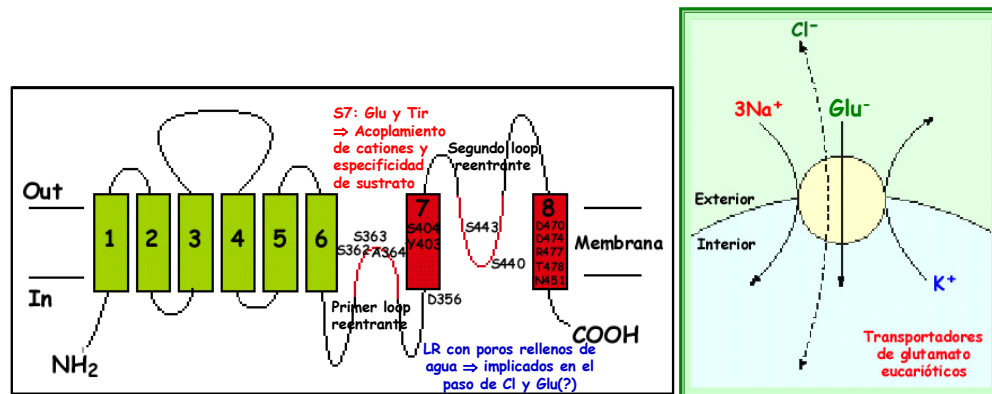


Imagen 10: Transportadores de glutamato de membrana plasmática. A) Modelo para la topología de membrana de los transportadores de glutamato. Los rectángulos indican las posiciones de las alfa-hélices transmembrana (1-8). Las regiones C-terminales implicadas en la unión de glutamato y cationes cotransportados se muestra en rojo. Los residuos implicados en el reconocimiento del glutamato y cationes se indican y numeran de acuerdo con la secuencia del transportador EAAT2 (GLT-1) de rata (Slotboom et al., 2001). **B) Actividades de transporte y canal asociadas a los transportadores de glutamato.** Los transportadores que se encuentran en el SNC usan la E libre almacenada en gradientes de Na^+ y K^+ a través de la membrana para conducir el transporte de glutamato (Glu) junto con un gradiente de protones (H^+). Además una actividad de canal de Cl^- se asocia con diferentes subtipos de transportadores de glutamato.

La afinidad (K_m) por glutamato de los diferentes isotipos de EAATs es similar, rondando de 10 a 20 μM . Por otro lado, la constante de unión (K_d) a glutamato de los EAATs varía en un orden de magnitud entre los transportadores (de 10 a 100 μM). Como esta constante se determina midiendo corrientes eléctricas dependientes de la activación del transportador, la K_d nos da información sobre las concentraciones de glutamato requeridas para que el EAAT transporte glutamato. Bergles y cols. 2002 (Tzingounis and Wadiche, 2007) midieron la K_d mediante parches *outside-out* y determinaron que EAAT1 y 2 tienen K_d s que rondan 100 μM mientras que la K_d de EAAT3 y 4 está entre 4 y 10 μM . Esto tiene importantes implicaciones fisiológicas porque aunque la K_m de todas las isoformas sea semejante, la K_d indica que EAAT3 y 4 responden a concentraciones 10 veces más bajas de glutamato que EAAT2. Por lo tanto se considera que EAAT3 y 4 actúan como tamponadores de la concentración de glutamato, mientras que EAAT1 y 2 funcionan como sumideros que se activan a concentraciones más elevadas de este neurotransmisor (Tzingounis and Wadiche, 2007).

Diferentes alteraciones han relacionado a los EAATs con varias patologías, aunque es difícil determinar si las mismas son causa o consecuencia de estas enfermedades (Beart and O'Shea, 2007). Por ejemplo, algunos grupos han relacionado la expresión de variantes aberrantes de splicing de EAAT2 que presentan una distribución alterada del transportador en la membrana en esclerosis lateral amiotrófica (ALS) tanto en modelos animales como en muestras de humanos. De acuerdo con esto, la sobreexpresión de EAATs mediante vectores en células gliales implantadas en la médula espinal puede revertir la muerte neuronal y alargar la supervivencia de los animales en modelos de ALS (Lepore et al., 2008). En gliomas humanos se ha encontrado que la expresión de algunas variantes de splicing de EAAT2 suprimen el transporte de glutamato (Beart and O'Shea, 2007). Otras patologías como la epilepsia, enfermedad de Huntington, infecciones, glaucoma, esquizofrenia y depresión también muestran alteraciones de los EAATs, ya sea por incremento o decrecimiento de la cantidad de proteína o por alteración de la funcionalidad de los transportadores debido a la acumulación extracelular de glutamato (Beart and O'Shea, 2007).

2.2 Papel del glutamato en la isquemia cerebral

2.2.1 Alteraciones de aminoácidos neurotransmisores excitatorios e inhibitorios durante la isquemia cerebral

Como hemos visto, de los múltiples neurotransmisores liberados durante la despolarización anóxica, el que alcanza mayor concentración es el glutamato. La consecuencia de la liberación masiva de este neurotransmisor es la activación excesiva de los receptores NMDA y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que provoca una elevación del Ca^{2+} citosólico, conduciendo a una respuesta molecular conocida como excitotoxicidad que puede llevar a la muerte celular (Castillo et al., 2003) (Imagen 2, Imagen 10) (ver apartado 1.2.1) Aunque los receptores de glutamato implicados en este proceso son principalmente los receptores NMDA y AMPA, cuya superactivación conduce a acumulación de Na^+ , Ca^{2+} , Cl^- y agua, hinchamiento celular y edema citotóxico, también se ha observado la implicación de los receptores metabotrópicos (mGluRs). La superactivación de estos receptores produce sobrecarga mitocondrial de Ca^{2+} , inhibición de la síntesis de ATP y rotura de proteínas, fosfolípidos y ácidos nucleicos por activación de fosfolipasas, proteasas y endonucleasas Ca^{2+} -dependientes, que generan aun una mayor elevación de Ca^{2+} y liberación de glutamato propagándose así la excitotoxicidad (Aarts and Tymianski, 2004; Nicholls, 2004).

A pesar de no presentar incrementos tan notables como el glutamato, otros neurotransmisores aparecen en el espacio extracelular durante la isquemia cerebral como consecuencia de la despolarización anóxica, principalmente la glicina y GABA. La glicina es un co-activador necesario del receptor NMDA y su excesiva liberación durante la isquemia origina un aumento de la estimulación del receptor y un mayor daño neuronal. La síntesis de GABA, principal aminoácido neurotransmisor inhibitorio en el SNC, aumenta durante la isquemia, favorecida por el aumento de la concentración del glutamato, por el aumento de la actividad del GAD (que es independiente del ATP y más activa en presencia de acidosis), y por la inhibición de la enzima GABA-T (más activa con pH alcalino). Al mismo tiempo, la despolarización de la membrana neuronal originada por la isquemia, conduce a la liberación del GABA en

el espacio extracelular, donde llega a alcanzar niveles 250 veces más elevados que en situaciones fisiológicas. Además se ha demostrado que tanto la reducción del ATP, el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, la formación de ROS y la acumulación de ácido araquidónico y eicosanoides que se produce durante la isquemia cerebral, alteran la neurotransmisión GABAérgica (Hossmann, 2006).

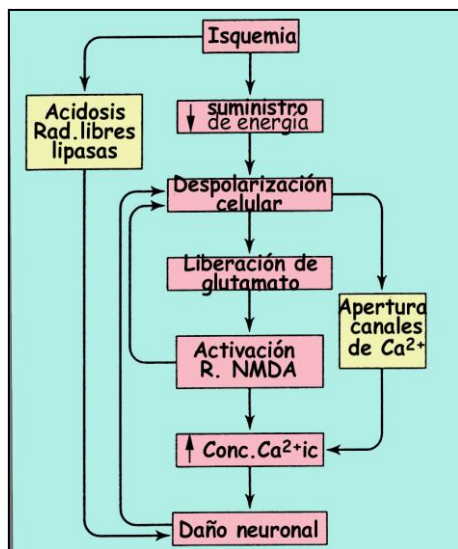


Imagen 11: Rutas potenciales que conducen al daño neuronal tras un episodio de daño isquémico. Un episodio isquémico inicia una compleja ruta que implica la depleción de los almacenes de energía celular y la liberación de radicales libres. La depleción de energía provoca una activación sostenida de los receptores de glutamato y la consecuente entrada de calcio vía receptores NMDA, AMPA y canales de Ca^{2+} - voltaje-dependientes (VDCC). La elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ produce la activación de enzimas dependientes de calcio. La despolarización neuronal excesiva provoca daño neural y muerte celular.

2.2.2 Alteración de transportadores de glutamato en la isquemia cerebral

La posible implicación de los VGLUTs en la isquemia cerebral, no ha sido apenas estudiada previamente. Kim et al.(2006), determinaron en el modelo de isquemia global de gerbo, que afecta específicamente al hipocampo, que después de 4 días de perfusión VGLUT2 disminuye abruptamente en aproximadamente un 80% de su nivel basal de expresión en CA1, mientras que VGLUT1 no se altera. Sin embargo sugieren que la disminución de VGLUT2 puede deberse a muerte neuronal más que una alteración en la expresión de la proteína. La relevancia de estos resultados para el ictus en humanos es cuestionable especialmente por el breve tiempo de isquemia utilizado, que fue de 5 min, si consideramos que las personas que sufren un ictus pueden sufrir una etapa aguda muy prolongada, de incluso varias horas. Debido a la brevedad del período de exposición a la isquemia utilizado este modelo podría considerarse más un modelo de preconditionamiento isquémico. Por otro lado, Vemuganti (2005) determinó mediante RT-qPCR, que en un período de 24 horas de perfusión, los niveles de ARNm de VGLUT1 y 2 no se alteraban, mientras que el mismo protocolo indujo una reducción significativa de la expresión del transportador vesicular de GABA (VGAT).

A diferencia de los VGLUTs, existen muchos estudios en la literatura referentes a la respuesta de los EAATs frente a la isquemia. Como se ha dicho, en condiciones normales los EAATs cotransportan glutamato con Na^+ a favor de gradiente. Durante la isquemia prolongada la ausencia de ATP impide la actividad de las ATPasas Na^+-K^+ - dependientes que devuelven el Na^+ al espacio extracelular, por lo que el Na^+ es eliminado a través de los EAATs por transporte reverso junto con el glutamato (Hazell, 2007). Esta inversión en el transporte de glutamato tardaría en comenzar unos 20

minutos, que es el tiempo que tardan en agotarse las reservas energéticas de los astrocitos (Camacho, 2006). Por lo tanto, la regulación de la expresión y actividad de los EAATs es muy relevante en la fisiopatología de la isquemia.

¿Qué ocurriría si los EAATs fuesen eliminados con el objetivo de evitar el transporte reverso de glutamato?

Tras un período de isquemia transitoria de 1 hora la expresión de EAAT2, tanto a nivel de ARNm como de proteína, disminuyen paulatinamente a lo largo de un período de 6 a 72 horas de reperfusión (Rao et al., 2001a), lo que sugiere una regulación intrínseca de estos transportadores; sin embargo, la eliminación de EAAT2 mediante oligonucleótidos antisentido, previa a la isquemia, tiene como consecuencia un aumento del edema y del volumen del área infartada después de la lesión (Rao et al., 2001b). Por tanto, es importante destacar que a pesar del efecto perjudicial que conlleva la liberación de glutamato por transporte reverso, este mecanismo de eliminación de Na^+ podría contribuir a la reducción del edema.

Posiblemente el efecto de la eliminación de EAAT2 esté vinculado a la presencia de estos transportadores en células endoteliales ya que éstos contribuyen durante la reperfusión a eliminar el exceso de glutamato transportándolo hacia el plasma, siendo este un nuevo mecanismo neuroprotector (Teichberg et al., 2009). Este hecho ha tenido recientemente su correlato clínico, ya que se ha observado que los niveles plasmáticos de glutamato se incrementan tras el ictus, siendo por tanto un poderoso biomarcador predictor de la extensión de la lesión en la fase aguda del ictus isquémico, pudiendo usarse como marcador del tejido con riesgo de infarto (Castellanos et al., 2008). Esto es importante, ya que sugiere que las terapias dirigidas a incrementar la eficacia de estos transportadores, así como a retirar el glutamato del plasma, pueden ser beneficiosas en el tratamiento del ictus agudo. En este sentido, trabajos recientes de Campos et al. (2011) muestran que el tratamiento de ratas isquémicas con glutámico oxalacético transaminasa (GOT), como sumidero del glutamato plasmático procedente del cerebro, reduce el tamaño del infarto, el volumen de edema y el déficit sensorio-motor de estos animales (Campos et al., 2011b) y que niveles altos de GOT y GPT plasmáticas se correlacionan con una mejor recuperación de pacientes que han sufrido un ictus agudo, probablemente debido a la bajada de los niveles cerebrales de glutamato (Campos et al., 2011a). Estos resultados apoyan evidencias anteriores sobre la existencia de polimorfismos (cambio del sitio para AP2 por un sitio para GCF2) en el promotor del gen de EAAT2 que se asocia con los altos niveles de glutamato plasmático encontrados tras un ictus y con la alta frecuencia en el deterioro neurológico (Mallolas et al., 2006), lo que sugiere un mecanismo mediante el cual un promotor puede predisponer a una serie de pacientes a regular a la baja la expresión de EAAT2 tras la isquemia, presumiblemente conduciendo a un elevado glutamato extracelular y a una deficiente eliminación del mismo.

Por otro lado la expresión de EAAT1, 2 y 3 parece aumentar después de un período de preconditionamiento isquémico, (Gottlieb et al., 2000; Cimarosti et al., 2005; Pradillo et al., 2006) tanto en la corteza como en la región CA1 del hipocampo. Como se considera que el preconditionamiento protege al SNC ante una eventual lesión más intensa, se podría sugerir que este incremento de EAATs prepararía al tejido para reabsorber el glutamato liberado durante la despolarización anóxica de forma más

eficiente. No obstante, no se podría descartar la posibilidad de que el exceso de EAATs, en particular de EAAT2, pudiera suponer también un incremento de la liberación de glutamato por transporte reverso durante la isquemia, más no en la reperusión.

3. Neurogénesis de la zona subventricular (SVZ): Mecanismos moleculares y relación con el glutamato y la isquemia cerebral

3.1 Neurogénesis de la SVZ: Tipos celulares

La neurogénesis en animales adultos es un proceso aún muy discutido que progresivamente ha ido ganando aceptación y en base al cual se están diseñando hoy en día diferentes aproximaciones experimentales para el tratamiento de diversas enfermedades del sistema nervioso, ya sea mediante la potenciación del proceso de neurogénesis endógeno o el cultivo de células precursoras *in vitro* que posteriormente podrán ser implantadas en las zonas lesionadas (Agasse F, 2007).

En el cerebro mamífero actualmente se reconocen dos zonas neurogénicas: la zona subgranular (SGZ) del giro dentado (GD) del hipocampo y en la zona subventricular (SVZ) que cubre los ventrículos laterales (VL) (Agasse F, 2007). Por su relación con la isquemia, nosotros haremos referencia principalmente a la SVZ.

La zona ventricular produce células madre neurales que forman la corteza durante el desarrollo embrionario. Una vez concluido el desarrollo la zona ventricular se convierte en SVZ, que se separa del ventrículo por la capa de células endodimales. La SVZ está separada del ventrículo por una capa de células endodimales y tanicitos (Imagen 12) (Quinones-Hinojosa et al., 2006; Agasse et al., 2007).

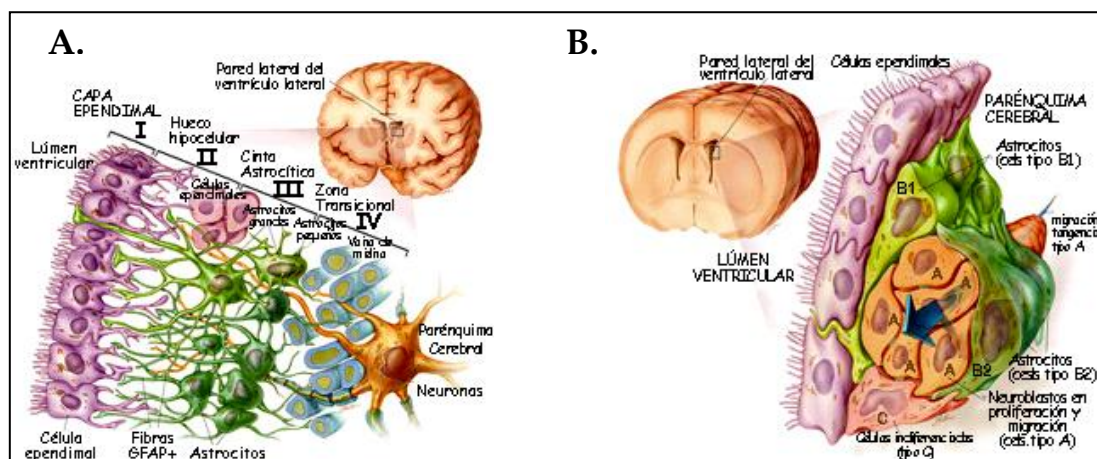


Imagen 12: Comparación de la organización de la SVZ humana frente a la de ratón o rata A) En humanos la SVZ está conformada por cuatro capas diferenciadas: I-Células endodimales, II-Capa hipocelular, III-Cinturón de astrocitos y IV Zona de transición. B) En roedores, una monocapa de células endodimales separa el ventrículo del cerebro. Bajo ésta, los astrocitos forman el tubo glial por el que los neuroblastos migran en la RMS. Adaptado de Quinones-Hinojosa et al. (2006).

En humanos la SVZ está formada por cuatro capas perfectamente organizadas. Entre éstas, son de particular interés las capas II y III. La capa II no presenta cuerpos celulares sino sitios de interconexión entre procesos de las células endodimales y de los astrocitos de la capa III, y se ha propuesto que sería un sitio donde la proliferación

estaría regulada por células de la capa I y III en etapas tempranas de desarrollo o ser un pasillo para la migración de células precursoras neurales (CPNs). Por otro lado, se piensa que algunos de los astrocitos de la capa III podrían retener actividad proliferativa (Quinones-Hinojosa et al., 2006).

Existen tres tipos de células que participan en la neurogénesis en la SVZ (García-Verdugo et al., 1998): Las células tipo B son células de tipo astrocitario que expresan marcadores como GFAP, nestina y vimentina. Durante el proceso de división parte de estas células genera células tipo C, que tiene una alta tasa de proliferación y se caracterizan por la expresión de nestina. A partir de las células tipo C se diferencian las células tipo A, que son los neuroblastos que irán migrando por el cinturón glial a lo largo de la RMS. Las células A se caracterizan por la expresión de Beta-3-tubulina (B3T), PSA-NCAM y DCX y el factor de transcripción Dlx-2. Una vez los neuroblastos alcanzan el bulbo olfativo se diferencian a interneuronas (Abrous et al., 2005; Quinones-Hinojosa et al., 2006) (Imagen 13).

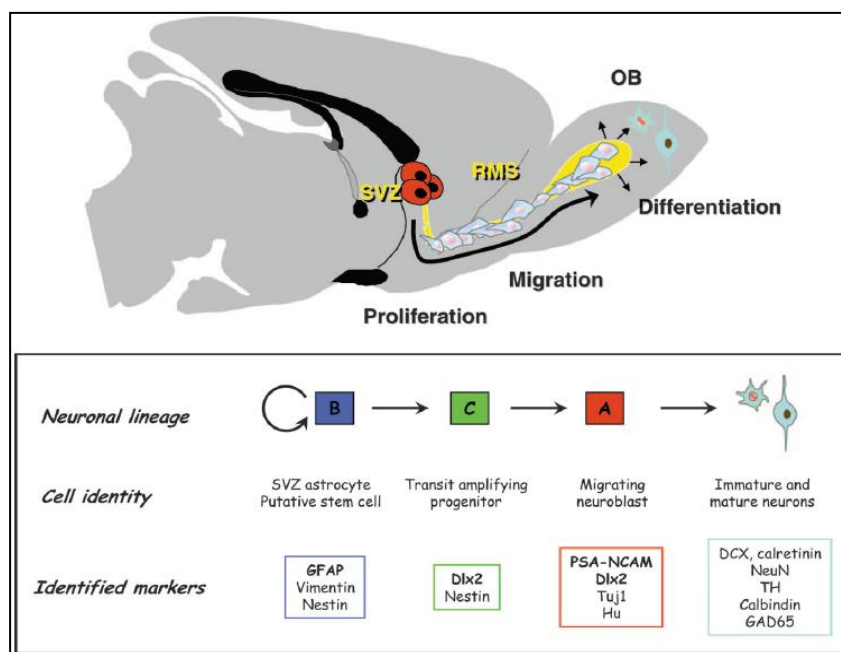


Imagen 13: Esquema del proceso de migración de CPNs desde la SVZ hacia el bulbo olfativo a lo largo de la RMS. Tipos celulares que se pueden observar a lo largo del proceso y marcadores específicos que se pueden utilizar para su inmunodetección. Las células B pueden ser astrocitos o células precursoras que se dividen generando nuevas células de división transitoria (células C), que a su vez se diferencian a neuroblastos (células A) y posteriormente a neuronas a medida que se desplazan por la RMS. Tomado de Abrous et al. (2005).

3.2 Mecanismos moleculares implicados en la regulación de la neurogénesis de la corriente migratoria rostral (RMS).

3.2.1 Regulación por Factores de crecimiento y señales extracelulares.

En los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por desentrañar los mecanismos que controlan la migración de los neuroblastos a través de la RMS. Diversos estímulos, particularmente los factores de crecimiento, influyen en este proceso. BDNF parece ser el factor neurotrófico más importante en su regulación, que parece funcionar como un regulador de la velocidad de migración de los neuroblastos hacia el bulbo olfativo (Bagley and Belluscio, 2010). Sin embargo existen muchos otros factores (FGF-2, EGF, TGF, VEGF, CNTF) que pueden modular diversos aspectos de la neurogénesis, aunque mayormente parecen estar implicados en la proliferación más que en la diferenciación. (Bath and Lee, 2010). Curiosamente, y como veremos más adelante, la liberación de BDNF puede ser modulada por neurotransmisores como el glutamato, lo cual sugiere que la interacción de este neurotransmisor con los factores neurotróficos debe ser explorada para entender mejor el proceso de neurogénesis en condiciones normales y patológicas.

Trabajos más recientes están comenzando a mostrar la implicación de otras moléculas que inesperadamente participan en el proceso. Kaneko et al. (2010) han descrito recientemente la participación de la glicoproteína Slit1 y sus receptores ROBO en la migración a lo largo de la RMS. Estos autores determinaron que la ausencia de Slit1 produce una desorganización del tubo glial a través del cual migran los neuroblastos, disminuyendo un 40% la velocidad de migración en la RMS. Esto es debido a que Slit1 es un factor de repulsión entre células. Sin embargo la activación del receptor ROBO por Slit1 promueve la formación de surcos que sirven de apoyo a la migración de los neuroblastos. Por lo tanto el tubo glial no es una estructura fija sino que puede ser remodelada por los neuroblastos facilitando su propia migración.

3.2.2 Regulación por mecanismos intracelulares: Factores transcripcionales y receptores intracelulares

Evidencias actuales ponen de manifiesto que la neurogénesis post-natal, tanto en la SVZ como en la SGZ, también está sometida a una regulación muy precisa realizada por señales intracelulares (factores transcripcionales con el motivo hélice-giro-hélice básicos (bHLH) como las neurogeninas, microRNAs (miRNAs), DISC1 (gen de susceptibilidad a la esquizofrenia 1), CREB (cAMP response element binding), etc.) que regulan procesos tempranos como proliferación, diferenciación y migración, tanto como los tardíos (supervivencia, integración sináptica, desarrollo dendrítico) de las células precursoras neuronales (Pathania y col., 2010). Recientemente, también se ha observado un papel muy importante en la neurogénesis de distintos receptores nucleares (ER β , RAR $\alpha\beta\gamma$, PPAR γ , NURR1, TLX, SOX2, etc.), actuando sobre distintos aspectos de la diferenciación y proliferación neuronal (Jeong y Mangelsdorf, 2009), siendo destacable la función del receptor nuclear huérfano TLX (también conocido como NR2E1) sobre la capacidad de autorenovación y proliferación de las NSCs adultas, a través de un mecanismo de señalización que implica el reclutamiento de las histona-deacetilasas 3 y 5 (HDAC3 y HDAC5) y la represión transcripcional del inhibidor de Cdk's p21 y del gen supresor de tumores PTEN (Sun y col., 2007), así

como la activación de la ruta de Wnt/ β catenina (Qu y col., 2010). Por su parte SOX2 activa la expresión de Hes5, que en conjunto con la vía de Notch, induce la expresión de genes que retienen la diferenciación de las CPNs manteniéndolas en un estado proliferativo (Qu and Shi, 2009).

3.2.3 Papel de los neurotransmisores en la neurogénesis de la SVZ

Estudios desarrollados durante la última década han empezado a poner de manifiesto la importancia de neurotransmisores como el GABA y glutamato, serotonina, dopamina o acetilcolina en la regulación de la neurogénesis (Banasr et al., 2004; Coronas et al., 2004; Gu et al., 2009; Kim et al., 2010b; Platel et al., 2010a).

Las CPNs expresan diferentes tipos de receptores de glutamato y GABA dependiendo del estadio de desarrollo en que se encuentren. Así por ejemplo Nakamichi et al. (2009) han demostrado mediante RT-qPCR la presencia de transcritos para diferentes subunidades de los receptores ionotrópicos GABA_A y GABA_C y el metabotrópico GABA_B, así como para distintas subunidades de los receptores de NMDA, AMPA, kainato y para receptores metabotrópicos del grupo I, II y III, en neuroesferas derivadas de la corteza. Sin embargo, el patrón de expresión de estos receptores varía con el tiempo, alterando la susceptibilidad de las CPNs al GABA o glutamato.

En la SVZ el GABA se sintetiza por las CPNs y se libera al medio en respuesta a incrementos de Ca^{2+} que pueden producirse durante la migración o como respuesta a señales ambientales (Platel et al., 2007). Por su parte, en la RMS el glutamato se libera, mediante un mecanismo dependiente de Ca^{2+} , por el transportador VGLUT1 desde los astrocitos que rodean la corriente de neuroblastos (Platel et al., 2010b). El GABA puede funcionar como un regulador negativo de la proliferación y velocidad de migración de neuroblastos y facilitar su formación de dendritas al incorporarse al bulbo olfatorio (Platel et al., 2008a; Platel et al., 2008b). La respuesta de las CPNs y neuroblastos al glutamato depende del tipo de receptor activado y puede influir en múltiples aspectos de la neurogénesis. La inhibición del receptor mGluR5 mediante MCPG (1 μ M) aumenta el número de neuroblastos que mueren por apoptosis, mientras que el inhibidor del receptor mGluR1, CPCCOEt (30 μ M), aumenta el número de neuroblastos viables (Castiglione et al., 2008). Antagonistas del receptor de kainato GluR5 (GluK5 o GluK2) aceleran la migración de neuroblastos, pero la inhibición del receptor mGluR5 no altera este proceso (Platel et al., 2007). Sin embargo la activación del receptor mGluR5, tanto *in vitro* como *in vivo*, aumenta la proliferación de CPNs (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005). También se ha visto que conforme los neuroblastos se aproximan al bulbo olfatorio van adquiriendo gradualmente receptores NMDA, cuya respuesta es esencial para su supervivencia pero no influye en la velocidad de migración (Imagen 14) (Platel et al., 2010a). En conjunto esto indica no sólo que el glutamato participa activamente en la neurogénesis, sino que su efecto dependerá del balance de señales intracelulares activadas por los diferentes receptores.

Nakamichi et al. (2009) han encontrado resultados complementarios a los anteriores al evaluar el efecto de estos neurotransmisores sobre la diferenciación. En su modelo experimental el GABA promueve la proliferación de células precursoras

neurales a través de sus receptores GABA_A y GABA_B, pero mientras que los primeros promueven la diferenciación a astrocitos en presencia de CNTF, los segundos promueven la diferenciación a neuronas en presencia del ácido trans-retinoico (ATRA). Por el contrario, el glutamato parece suprimir la proliferación de células precursoras a través de sus receptores NMDA y de receptores metabotrópicos mGluR de la clase III, promoviendo la diferenciación a neuronas o a astrocitos, respectivamente. Las diferencias sobre proliferación probablemente se deban al modelo experimental utilizado, ya que otros grupos trabajaron con células obtenidas de la SVZ, mientras que Nakamichi et al. lo hicieron con neuroesferas derivadas de las capas profundas de la corteza, un modelo menos explorado. Además, se ha demostrado que la corteza emite factores solubles capaces de reducir la proliferación y diferenciación de neuroblastos (Agasse et al., 2004), por lo que parte de los resultados de Nakamichi et al. Podrían deberse a que las células que utilizaron deriven de explantes corticales.

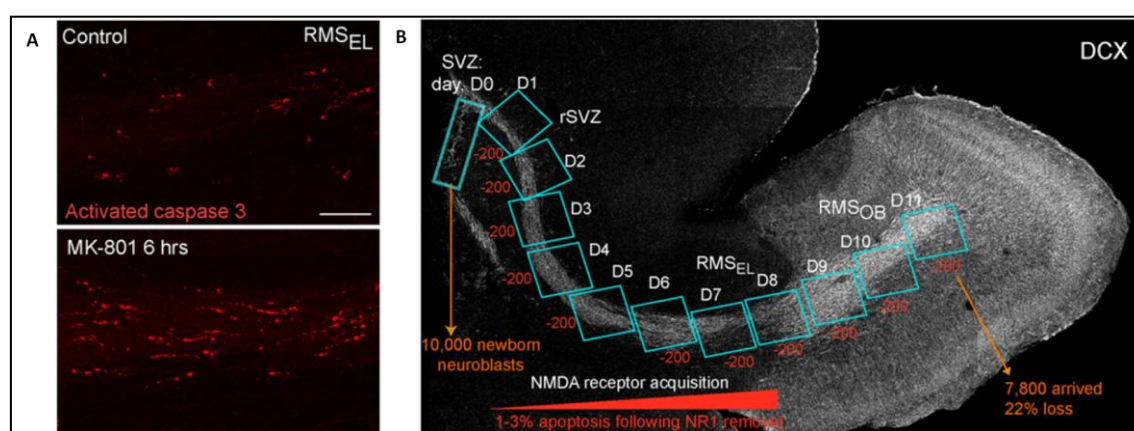


Imagen 14: El bloqueo farmacológico “in vivo” o la eliminación genética de los receptores de glutamato NMDARs decrece la supervivencia de neuroblastos. El tratamiento con MK-801, o la eliminación por electroporación de la subunidad NR1 aumentan el número de neuroblastos con caspasa 3 activa en la RMS. **A)** Imágenes confocales mostrando el inmunomarcaje para la caspasa 3 (rojo) en la RMS de los ratones DCX-GFP controles y de los tratados con MK-801. Escala: 100 μM. **B)** Modelo ilustrando el efecto de incremento de apoptosis predicho sobre la pérdida celular acumulada a lo largo de la ruta de migración RMS. La apoptosis conduce a una pérdida del 22% de la población inicial de neuroblastos desde la SVZ hasta el OB. Adaptado de Platel et al., 2010.

Estas evidencias, en conjunto, indican que el balance entre GABA y glutamato regularía la proliferación, migración y diferenciación de neuroblastos.

Si bien la influencia del glutamato y el GABA es evidente, es importante considerar la posibilidad de que otros neurotransmisores también afecten el proceso de neurogénesis adulta tanto en animales sanos como en situaciones patológicas. Así pues, diversos trabajos han mostrado evidencias de la influencia de la dopamina y serotonina en las diferentes etapas de la neurogénesis.

Las células derivadas de la SVZ expresan receptores dopaminérgicos D3 que responden a la estimulación con apomorfina produciendo un aumento de la proliferación. Los receptores D3 se co-expresan con nestina y B3T principalmente y en escasas ocasiones con GFAP, lo que sugiere que el receptor puede estar implicado en la diferenciación a neuronas de las células madre *in vitro* (Coronas et al., 2004). Kim y

cols. (2010a) indican que el receptor D3 se expresa en células precursoras y de tipo astrocitario en la SVZ, pero no así en neuroblastos o astrocitos del estriado. Por otro lado, los receptores D1, 2, 4 y 5 también se expresan por los neuroblastos. El antagonismo farmacológico del receptor D3 disminuye la proliferación en la SVZ y la cantidad de interneuronas que expresan calbindina, calretinina y tiroxina hidroxilasa marcadas con BrdU en el bulbo olfatorio 4 semanas después del tratamiento.

La activación aguda o crónica de los receptores de serotonina 5-HT1a y 5-HT2 mediante agonistas específicos incrementa el número de células marcadas con BrdU en la SVZ y bulbo olfatorio, sin afectar la proporción de glía o nuevas neuronas, mientras que la activación de los receptores 5-HT1b bloquea la proliferación en la SVZ (Banar et al., 2004). Sin embargo, la activación crónica de los receptores 5-HT1a puede impedir la migración de las nuevas células hacia el bulbo olfatorio (Soumier et al., 2010).

3.3 Neurogénesis post-isquémica: Desplazamiento de las CPNs en migración hacia la corteza y estriado lesionados.

3.3.1 Neurogénesis y neuroreparación en la isquemia cerebral

Gran parte del trabajo realizado para desarrollar medicamentos que protejan al cerebro de la isquemia se ha orientado a inhibir la actividad glutamatérgica o a la interferencia de la cascada de señales intracelulares que activan la apoptosis, aunque sin éxito (Fernandez-Gomez and Hernandez, 2008). Es por esto que actualmente se está desarrollando la investigación orientada hacia la neuroreparación (Castillo et al., 2003). Existen múltiples aproximaciones que se están abordando, por ejemplo, el reclutamiento endógeno de células progenitoras derivadas de la médula ósea (Castillo et al., 2003) o su implantación sobre la zona lesionada a partir de células madre obtenidas de explantes estriatales de fetos humanos o por transdiferenciación de células de otros tejidos (Darsalia et al.; Ishibashi et al., 2004), o por la potenciación de la migración de neuroblastos desde la SVZ hacia la zona lesionada (Li et al., 2008; Wang et al., 2009; Harms et al., 2010).

Hemos visto que la neurogénesis en la SVZ es un proceso continuo que genera neuroblastos que se desplazan a través la RMS hacia el bulbo olfativo, en donde se diferencian a interneuronas. Sin embargo, la proliferación, migración y diferenciación de las células madre puede verse alterada por lesiones como la isquemia. Diferentes estudios, tanto *in vitro* como *in vivo* sugieren que los neuroblastos responden a estímulos emitidos desde la corteza y el estriado lesionado y migran hacia estas estructuras donde posteriormente se diferencian a interneuronas (Arvidsson et al., 2002; Agasse et al., 2004; Agasse et al., 2008; Li et al., 2008; Zhang et al., 2008; Chang et al., 2009; Sanchez-Mendoza et al., 2010). Así pues, varias preguntas importantes pueden plantearse: ¿cómo ocurre este proceso de desviación?, ¿puede ser desencadenado por la isquemia?, ¿participan las mismas señales moleculares que en la RMS? Además de señales atrayentes, ¿hay factores de repulsión?, ¿cuántas CPNs sobreviven al proceso de migración y se diferencian a neuronas que puedan establecer nuevos contactos sinápticos?

La proliferación y migración de neuroblastos hacia la zona isquémica se conoce desde hace varios años y diferentes grupos han realizado importantes trabajos en su caracterización. Arvidsson et al. (2002) demostraron que después de una lesión

unilateral las células madre neurales proliferan y migran hacia el estriado lesionado y pueden presentar marcadores de células maduras como Meis2 y Pbx 2 semanas después de la recuperación. Además el proceso de migración está íntimamente relacionado con el de angiogénesis (Thored et al., 2007). Zhang et al. (2009) mostraron con microscopía de tiempo continuo (*time-lapse microscopy*) que las células madre neurales penetran en el estriado usando un patrón exploratorio donde una de éstas emite proyecciones que presumiblemente le permiten evaluar las condiciones del medio. Posteriormente es seguida por otras células formando una cadena. Las mismas pueden alcanzar velocidades de 38 $\mu\text{m}/\text{h}$, semejante a la de la RMS. Esta característica sugiere que la migración de los neuroblastos al estriado puede ser en parte semejante a la migración a lo largo de la RMS.

En principio, las células madre neurales son resistentes a la hipoxia. Chen et al. (2010) sometieron neuroesferas a diferentes períodos de hipoxia y encontraron que la reoxigenación durante varios días producía un aumento en la viabilidad y proliferación celular. Así mismo, las esferas sufrían un incremento notable del diámetro y un aumento de hasta 20% en la incorporación de BrdU después de 12 horas de hipoxia. Curiosamente sólo las esferas sometidas a 24h de hipoxia sufrieron un aumento en el índice de apoptosis, medida por TUNEL; mientras que las esferas sometidas a 6 y 12h de hipoxia no la sufrieron. (Chen et al., 2010). Notablemente, Harms et al. (2010) determinaron que las neuronas en cultivo son más resistentes a la OGD si son cocultivadas con neuroesferas también sometidas a OGD.

No obstante, trabajos de Agasse y cols (2004) demostraron que el cultivo de neuroesferas obtenidas de la SVZ en un medio condicionado por explantes corticales, reducía tanto la incorporación de BrdU durante la etapa de proliferación como la diferenciación a neuronas. Sin embargo, el cultivo de las neuroesferas en un medio condicionado procedente de explantes corticales tratados con estaurosporina, promovía un aumento en el número de células que conforman la neuroesfera. Por lo tanto, en condiciones normales la corteza no genera ningún tipo de respuesta proliferativa o de migración sobre las células de la SVZ, pero una lesión cortical capaz de inducir apoptosis promueve la liberación de factores que difunden al medio alterando el estado proliferativo de las células madre. Entre los factores liberados como consecuencia de la isquemia que podrían regular directa o indirectamente este proceso destacan el BDNF, VEGF, IGF-1, TGF β , TNF α y el factor derivado de células estromales (SDF1 α) (Robin et al., 2006; Bernardino et al., 2008; Leker et al., 2009; Madri, 2009; Harms et al., 2010)

Estos diferentes factores tróficos pueden influenciar la desviación de las células madre de la RMS hacia la zona isquémica. Dichos factores pueden ser segregados por células endoteliales, neuroblastos, astrocitos o microglía, lo que indica que el proceso no es controlado por un tipo celular concreto sino que depende de la interacción entre la totalidad de los tipos celulares implicados.

BDNF puede ser liberado por neuronas o astrocitos (Robin et al., 2006; Bernardino et al., 2008; Jean et al., 2008; Leker et al., 2009; Madri, 2009; Harms et al., 2010) y tiene claros efectos sobre el daño isquémico. Por ejemplo, mejora el desempeño locomotor de los ratones en diversas pruebas como el “rotarod” o el “beam-balance”, efecto acompañado de una reducción del daño neurológico a lo largo de 6 semanas

(Schabitz et al., 2004). También reduce el número de células apoptóticas medidas por TUNEL en la penumbra (Ferrer et al., 2001), mientras que la introducción de un receptor TrkB truncado duplica el volumen de infarto en ratones sometidos a isquemia transitoria (Saarelainen et al., 2000). La inyección intravenosa de BDNF también aumenta el número de neuroblastos en el estriado y en el borde de la penumbra (Schabitz et al., 2007).

VEGF se incrementa rápidamente después de la isquemia en la corteza (Hayashi et al., 1997). Harms et al. (2010) determinaron que las neuronas en cultivo son más resistentes a la OGD si son cocultivadas con neuroesferas también sometidas a OGD, efecto mediado por la liberación HIF1 α dependiente de VEGF, por lo que las células madre neurales no sólo tienen la potencialidad de generar nuevas neuronas sino, además, la de proteger a las ya existentes. El uso de fármacos para promover su liberación, como la eritropoyetina humana recombinante (Wang et al., 2004) o Atorvastatina, (Chen et al., 2005) indica que este factor induce tanto angiogénesis como proliferación de neuroblastos en la SVZ y su migración a la corteza entre 14 y 28 días después de la lesión, acompañada de una mejoría en la actividad locomotora. La inyección de plásmidos con VEGF bajo el control del promotor constitutivo del citomegalovirus en el ventrículo lateral del hemisferio isquémico, induce un aumento del número de células marcadas con BrdU. Varias de estas células se diferenciaron a células endoteliales, mientras que otras, que se encuentran a lo largo del límite entre corteza y cuerpo calloso, expresaron marcadores de neurogénesis como TUJ-1 y MAP2 o de neuronas GABAérgicas, como GAD67, hasta 8 semanas después de la lesión. Además, se observó una notable reducción del volumen de infarto. Es de destacar que el número de células que expresan estos marcadores disminuye progresivamente a lo largo del estudio (Wang et al., 2009), lo que sugiere que VEGF puede estar implicado en la promoción de la proliferación, migración y diferenciación, aunque su implicación en la integración sináptica de estas nuevas neuronas sigue estando en duda. Dado que la expresión de BDNF parece depender de la actividad sináptica (Jean et al., 2008) sería interesante determinar si la sobreexpresión de VEGF en este sistema podría inhibir la función de BDNF o si sería posible combinar la sobreexpresión de VEGF con BDNF para promover la integración de estas nuevas neuronas y por tanto su supervivencia.

En un modelo de implantación de neuroesferas sobre cultivos organotípicos que contenían corteza y estriado sometidos a isquemia, Robin et al. (2006) determinaron que SDF1 α aumenta un 73% en las rodajas isquémicas comparadas con las no isquémicas y duplica la distancia recorrida por los neuroblastos a lo largo del tejido lesionado. Curiosamente la promoción de la migración depende de la cantidad de SDF1 α pues 500 ng de esta citoquina añadidos al medio triplican el número de neuroblastos en migración, pero su uso combinado con el inhibidor de la proteasa de SDF1 α , DPPIV y Aprotinina A, revierten este efecto. Por su parte, la inhibición del receptor CXCR4 mediante el uso de anticuerpos bloquea completamente la migración de los neuroblastos. Ohab et al. (2006) muestran que la angiogénesis está causalmente ligada a la neurogénesis. La expresión de SDF-1 α y angiopoyetina (Ang-1) aumenta en los vasos sanguíneos tras el ictus, y la acción trópica de estas dos moléculas a través de sus receptores reclutan miles de neuronas inmaduras a la corteza del peri-infarto. Por tanto, neurogénesis y angiogénesis están causalmente ligadas a través de la producción de SDF-1 α y Ang-1. Ambas citoquinas promueven la migración de neuroblastos tras la

isquemia y la recuperación neurológica (Ohab et al., 2006; Li et al., 2008). De forma interesante, SDF1- α también puede ser liberado desde la glía reactiva en el nicho neurovascular (Cali et al., 2008).

¿Puede la hipoxia favorecer la neurogénesis en humanos?

Santili et al. (2010) utilizando una línea inmortalizada de CPNs humanas, mostraron que la hipoxia leve (2,5-5% O₂) puede favorecer la proliferación de CPNs y la diferenciación de éstas a neuronas y oligodendrocitos frente a astrocitos. Sin embargo, la mayor parte de estas neuronas presentan un fenotipo GABAérgico. Curiosamente, las concentraciones de 1% y 20% O₂ indujeron un aumento significativo en la activación de las caspasas 3 y 9 y en la ruptura de la enzima PARP, pero no se encontraron alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial, indicando que en hipoxia severa o en normoxia las CPNs son más susceptibles a morir por apoptosis que en hipoxia leve. En conjunto, estas evidencias sugieren que la hipoxia leve puede favorecer la formación de neuronas a partir de CPNs humanas inmortalizadas, abriendo un interesante camino para su uso en terapia regenerativa.

En resumen, la migración de las CPNs de la SVZ hacia la zona isquémica está regulada por una multitud de factores que reducen el volumen del infarto y promueven la proliferación y migración de las células madre neurales hacia la zona lesionada. Estos factores pueden ser liberados por diferentes tipos celulares, lo cual debe ser tomado en cuenta a la hora de usarlos como dianas terapéuticas para poder regular correctamente su funcionamiento. Más adelante veremos cómo el glutamato puede modular la liberación de algunos de estos factores durante la reperusión y propondremos un hipótesis en la que este neurotransmisor pasa de ser una molécula tóxica en la isquemia a ser una molécula con potencialidad terapéutica.

3.3.2 ¿Pueden los neurotransmisores participar en el proceso de neurogénesis subsiguiente a un ictus?

Hasta ahora existen muy pocos trabajos que vinculen la actividad glutamatérgica en el hemisferio lesionado directamente con el proceso de neurogénesis. Di Giorgi-Gerevini et al.(2005) han mostrado que la depleción del receptor mGluR5 o su inhibición farmacológica mediante MCPG, disminuye el número de neuroblastos presentes en el cuerpo calloso isquémico durante la reperusión en un modelo de isquemia transitoria. Además la inhibición *in vitro* del receptor mGluR5 induce apoptosis en progenitores que están formando neuronas, mientras que la inhibición del receptor mGluR1 bloquea el ciclo celular e induce a la neurodiferenciación (Castiglione et al., 2008).

Existen otras evidencias indirectas de que la actividad glutamatérgica podría estar vinculada a la neurogénesis. En conjunto la mayoría de estos trabajos correlacionan un aumento en la actividad sináptica del hemisferio lesionado con una mejoría en la funcionalidad de las extremidades afectadas.

En ratas sometidas a oclusión transitoria de la arteria cerebral media (tMCAO) que son entrenadas en cintas de correr durante 14 días después de la isquemia, se observan mayores niveles de glutamato, BDNF y sinapsina 1 en el caudado putamen y un mejor desempeño de diversas pruebas motoras que las ratas no entrenadas (Chang et al., 2009). Curiosamente, Centonze et al. (2007) encontraron un aumento de

potenciales excitatorios post-sinápticos (EPSCs) en esta estructura tras inducir tMCAO. La estimulación de los bigotes de las ratas produjo un aumento en la concentración de SDF1 α y VEGF, así como un incremento en la migración de neuroblastos a lo largo del cuerpo calloso isquémico y de la incorporación de nuevas neuronas a la corteza isquémica (Li et al., 2008). Por otra parte, Lai et al. (2008) encontraron que tras 8 semanas de recuperación los neuroblastos manifiestan potenciales de acción y son sensibles a la tetrodotoxina. Además, la simple introducción de las ratas en un ambiente enriquecido con juguetes durante la recuperación induce un ligero incremento en el número de nuevas interneuronas en la corteza lesionada, aunque en este caso la mayor parte de las células generadas eran de tipo glial (Komitova et al., 2006). Sin embargo, es importante considerar el efecto de la edad sobre la neurogénesis. Recientemente Leasure y Grider (2010) indicaron que en ratas viejas el ejercicio voluntario después de la isquemia aumentó el número de células marcadas con BrdU; no obstante, después de 4 semanas, dichas células no parecían claramente diferenciadas a glia o a neuronas. Los autores hipotetizaron que podrían estar diferenciadas a células endoteliales aunque no lo comprobaron. En animales jóvenes las nuevas neuronas empiezan a aparecer a partir de los 30 días (Li et al., 2008; Chang et al., 2009), por lo que considerando la avanzada edad de los animales es factible pensar que el proceso de neurogénesis necesite más tiempo, quizás a consecuencia de una menor liberación de neurotrofinas como BDNF, VEGF o SDF1 α en estos animales. En conjunto, estos resultados sugieren que la activación cortico-estriatal por diferentes tipos de estimulación puede promover la neurorreparación, ya sea por formación de nuevas sinapsis de las neuronas supervivientes como efecto derivado de la exposición a factores tróficos, o como resultado de un proceso neurogénico que estaría también influido por la liberación de dichos factores tróficos desde los distintos tipos celulares implicados en el proceso.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS:

En las últimas dos décadas se han hecho esfuerzos sustanciales para entender los mecanismos bioquímicos implicados en el daño cerebrovascular y para desarrollar nuevos tratamientos. Actualmente el tratamiento agudo del ictus se centra en el uso de plasminógeno tisular recombinante (rt-PA), el cual reduce los trombos permitiendo la recirculación en el área afectada. Sin embargo, durante los últimos años se ha hecho evidente la necesidad de utilizar otras medidas farmacológicas que detengan las alteraciones metabólicas que se generan como consecuencia del infarto puesto que el rt-PA tiene una ventana terapéutica de menos de 3 horas y puede ser causante de hemorragias cerebrales (Fernandez-Gomez and Hernandez, 2008). Algunos ensayos *in vitro* indican que una mayor expresión de VGLUT1 en sinaptosomas se relaciona con una mayor liberación de glutamato al medio (Wilson et al., 2005), y diversos estudios indican que el aumento de la actividad motora de la extremidad afectada después de la lesión se correlaciona con un incremento de la actividad cortical correspondiente (Rossini et al., 2003; Centonze et al., 2007; Di Filippo et al., 2008). Adicionalmente y como terapia alternativa al uso de rt-PA, recientemente se han publicado diferentes trabajos que exploran la posibilidad de implantar CPNs en la zona de la lesión para intentar reestablecer su funcionalidad. Los altos niveles de VGLUTs en la corteza y caudado-putamen, las zonas más afectadas por la isquemia de la arteria cerebral media (ACM), y la propiedad de migración de las CPNs al área de la lesión nos ha llevado a plantearnos en esta tesis los siguientes objetivos en la búsqueda de dianas terapéuticas alternativas:

1. Evaluar los efectos de un proceso de isquemia severo sobre la expresión de los VGLUTs y EAATs, a nivel de proteína y ARNm, a lo largo de un proceso de reperfusión máximo de 7 días, en corteza y caudado-putamen de ratas sometidas a una isquemia focal transitoria.
2. Correlacionar los posibles cambios encontrados en la expresión de los VGLUTs con los cambios producidos en la expresión de los EAATs, consecuentes a la isquemia cerebral, dada la función complementaria de ambos tipos de transportadores en el recambio del glutamato, así como con los índices de deterioro neurológico.
3. Caracterizar la expresión de los VGLUTs y EAATs en células madre neurales derivadas de la SVZ en un período de diferenciación de 1 a 15 días, y correlacionarla con la expresión de marcadores representativos de las distintas etapas de neurogénesis.
4. Evaluar la posible implicación del glutamato y sus transportadores sobre la neurogénesis de la SVZ en condiciones basales y en respuesta a la isquemia experimental *in vitro*.
5. En base a los resultados obtenidos, construir una hipótesis sobre la posible utilidad de los VGLUTs como posible diana terapéutica en el tratamiento del ictus isquémico

III. Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS:

1. Modelos animales de isquemia focal transitoria de la Arteria Cerebral Media (ACM)

En esta tesis se ha utilizado el modelo de isquemia focal transitoria “in vivo” por oclusión de la arteria cerebral media (tMCAO), que se ha llevado a cabo mediante dos métodos experimentales: método del filamento intraluminal, llevado a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Joan Salom, del Hospital “La Fe” de Valencia, y método de ligadura de la arteria cerebral media, llevado a cabo en colaboración con el laboratorio del Dr. Ricardo Martínez, del Instituto Cajal de Madrid.

1.1 Método del filamento intraluminal

1.1.1 Preparación de los animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la raza Wistar (de aproximadamente 300g) estabuladas en condiciones de luz/oscuridad en ciclos de 12h. La preparación de los animales se realizó en dos días. El primer día se anestesiaron mediante inyección intramuscular de una mezcla de clorhidrato de ketamina (Ketolar, Parke-Davis S.L.) (75 mg/Kg), diazepam (Valium 10, Roche Farma S.A.) (7,5 mg/Kg) y sulfato de atropina (Atropina Braun, Braun Medical S.A.) (0,15 mg/Kg). La rata se coloca en decúbito prono sujeta a un aparato estereotáctico. Se realiza una incisión longitudinal a lo largo de la línea media y se separa la piel exponiendo el cráneo. Con ayuda de un taladro y de un microscopio quirúrgico se realiza un trepano a 2,5 mm respecto a Bregma y a 2,5 mm de la línea media para la implantación de la sonda de láser Doppler para monitorizar la variación del flujo sanguíneo durante la isquemia. La cánula se fija con cemento dental y con dos tornillos: uno situado a 3,5 mm a la derecha de la sutura sagital y a 4,5 mm por detrás de la sutura coronal, y otro a 2,5 mm a la izquierda de la sutura parietal y a 2,5 mm por delante de la sutura coronal.

El segundo día los animales son anestesiados profundamente con una inyección intramuscular de clorhidrato de ketamina (120 mg/Kg) y sulfato de atropina (0,3 mg/Kg) para permitir su intubación orotraqueal con una cánula de 16G. Una vez intubado el animal, se alojan las sondas láser-Doppler de fibra óptica (mod. MT B500-0 L 120, Perimed AB) en las respectivas guías, avanzando su extremo hasta establecer contacto suave con la corteza cerebral. El animal se coloca en posición de decúbito supino, fijado a la mesa de trabajo y conectado a un respirador (Harvard Rodent Ventilator mod. 683). La anestesia se mantiene con una mezcla de halotano (Fluothane, Zeneca Farma S.A.) 0,5 - 0,75% en N₂O y O₂ (70:30, respectivamente), un volumen de 2,5 mL por pulso y una frecuencia inicial de 55-60 pulsos/minuto. La temperatura corporal se mantiene a 37,5 °C durante todo el experimento mediante una manta calefactora y una sonda rectal (Yellow Springs Instrument mod. YSI 402) conectada a un medidor de temperatura (Letica mod. HB101/2) dotado de un sistema termostatzado.

1.1.2 Método de isquemia

El método de isquemia por oclusión de la ACM con un filamento intraluminal aplicado ha sido el descrito por Longa et al. (1989). Brevemente, se expone la arteria carótida derecha mediante una incisión longitudinal en la línea media ventral del cuello, se termocoagula la carótida externa y se liga la arteria pteriogopalatina. Luego se practica una incisión en la carótida externa a través de la que se introduce un filamento de nylon (4/0) de cabeza redondeada (Imagen 15A) que se adelanta a través de la carótida interna hasta alcanzar la arteria cerebral media. La isquemia se hace evidente al detectar un descenso brusco del flujo sanguíneo mediante la sonda de láser Doppler (Imagen 15B). El período isquémico se mantiene durante 90 minutos. Posteriormente el filamento de nylon es retirado permitiendo la reperusión y la incisión en el cuello es suturada. Finalmente se retira la sonda Doppler y se permite la reperusión durante un tiempo determinado. Para la obtención de cortes histológicos el animal es anestesiado y perfundido con paraformaldehído al 4% en PBS (PANREAC) a los 3 días de reperusión. El cerebro es retirado, crioprotegido en sacarosa y post fijado en paraformaldehído al 4% y cortado en un criostato en rodajas coronales de 25µm para inmunohistoquímica para microscopía revelada por DAB o de fluorescencia. Los cortes son preservados a -80°C en solución crioprotectora. Para extracción de proteínas o de ARNm los animales son sacrificados a 6h, 1, 3 y 7 días. Los cerebros son retirados y congelados rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente a almacenados a -80°C hasta su utilización.

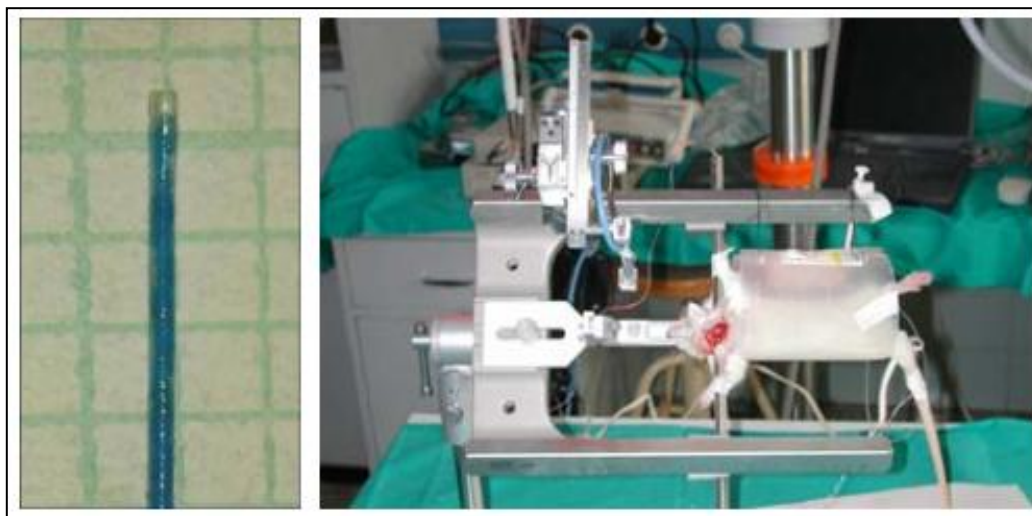


Imagen 15: Izquierda: filamento intraluminal. Derecha: rata anestesiada y colocada en un marco estereotáxico, a la que se le va a medir el flujo sanguíneo cerebral mediante láser Doppler.

1.2 Método de ligadura de la ACM

1.2.1 Preparación de los animales

Se utilizaron ratas macho adultas de la raza Wistar (de aproximadamente 300g) estabuladas en condiciones de luz/oscuridad en ciclos de 12h. La temperatura corporal se mantuvo a 37,5 °C durante todo el experimento mediante una manta calefactora.

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina (5g/100ml clorhidrato) Xilacina (20 mg/mL). Se mezclan 800 μ L de Ketamina, 200 μ L de Xilacina para un total de 1mL, y se inyectan un máximo de tres dosis de 300 μ L o hasta observar que el animal está dormido.

1.2.2 Método de isquemia.

Para realizar la isquemia por el método de la ligadura se siguió el procedimiento descrito por Prieto-Arribas et al. (2008). Brevemente, se coloca al animal en decúbito supino y se fija a la mesa de trabajo mediante cinta adhesiva. Se realiza una incisión a la altura del cuello de 3 cm en orientación cráneo-caudal. Se incide la piel, tejido celular subcutáneo y fascia del músculo cutáneo en un solo plano hasta visualizar las glándulas salivares submaxilares y los nódulos linfoides en la porción más anterior. Con la ayuda de retractores se retiran los músculos hasta visualizar la arteria carótida común y el nervio vago surcando la cara externa de la arteria carótida interna. Se aísla la carótida común pasando un asa delgada de látex alrededor de ésta y se avanza en la disección hacia su bifurcación en las ramas arteria carótida externa y arteria carótida interna evitando lesionar el nervio vago (Imagen). La lesión del nervio vago causaría parada cardio-respiratoria al animal de forma inmediata. Se ligan ambas carótidas transitoriamente para reducir el flujo sanguíneo usando una seda de 6/0. Posteriormente se coloca al animal en decúbito prono y se fija en el aparato esterotático. Se realiza una incisión por la línea media para separar la piel y se diseca subperióticamente el músculo temporal. A continuación se practica una craneotomía a la altura del tronco de la ACM sobre la fisura rinal. Mediante un microscopio quirúrgico se expone la ACM en el área cortical en la que se bifurca en las ramas frontal y parietal, justo junto a la vena cerebral inferior. La duramadre se abre y se liga la arteria con una sutura de monofilamento de nailon 9/0 o 10/0. Una vez ligada la ACM, se confirma visualmente la interrupción del flujo sanguíneo bajo el microscopio quirúrgico. Se mantiene la ligadura durante 1,5 h. Finalmente se retira la ligadura de la ACM y de las carótidas, se cierran todas las incisiones y se deja al animal recuperarse sobre una manta calefactora. Se da al animal un período de 3 días de reperusión. Tras este período el animal es anestesiado y perfundido con paraformaldehído al 4% en PBS (PANREAC). El cerebro es retirado, post fijado en paraformaldehído al 4% y cortado en un vibrátomo en rodajas coronales de 30 μ m para inmunohistoquímica para microscopía electrónica.

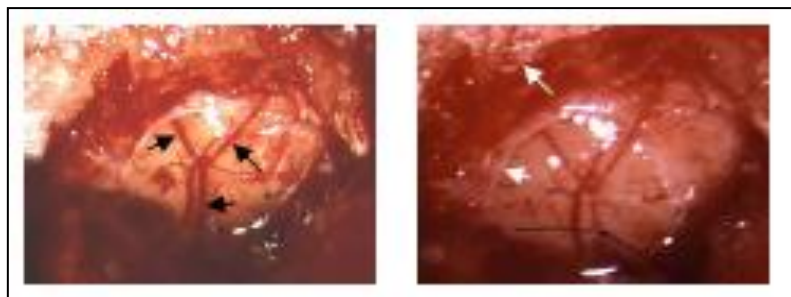


Imagen 16: Arteria cerebral media y su bifurcación expuesta tras craneotomía. Izquierda: se observa el tronco de la ACM (flecha inferior) y la bifurcación en sus ramas frontal (flecha de la izquierda) y parietal (flecha de la derecha). Derecha: la ACM se ha ligado haciendo un nudo con una sutura. Se aprecia reducción del flujo sanguíneo. Se observa la ventana abierta en el cráneo (flecha blanca superior) y en las meninges (flecha blanca inferior).

2. Cultivos celulares

2.1 Medios de cultivo

Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C y en una atmósfera de 95% aire 5% CO₂. La tripsina-EDTA procedía de GIBCO BRL- Life Technologies (Eggenstein, Alemania). El medio de disección fue Hank's Basal Saline Solution (HBSS) con 1% de antibiótico. El medio de cultivo utilizado para neuronas, astrocitos y neuroesferas fue DMEM/F12 con Glutamax, 1% antibiótico-antifúngico, 1% B27, A este medio se añadieron 20 ng/mL de EGF como factor de crecimiento exclusivamente en la fase de formación de neuroesferas. En los cultivos de neuronas y astrocitos se utilizó temporalmente 10% de suero fetal de ternera (FCS).

Para los experimentos de privación de oxígeno y glucosa el medio utilizado fue DMEM **sin glucosa** (medio OGD) y con antibiótico al 1%. Para las células control se usó medio DMEM **con glucosa**.

A menos que se indique lo contrario, las células fueron sembradas en placas o cristales pretratados con 20 µg/µL de poli-D-lisina a las densidades indicadas.

2.2 Cultivo de neuronas

El cultivo se realizó con fetos de ratas Wistar sacrificados entre E17-19 mediante una técnica basada en los métodos descritos por Segal et al. (1983) y Alcázar et al. (1997), con algunas modificaciones. Brevemente, las ratas gestantes fueron sacrificadas por decapitación, se extrajeron los fetos de la bolsa amniótica, fueron decapitados, se expuso el cerebro y se obtuvo un fragmento de corteza usando pinzas de disección que fue colocado en medio de disección. Se retiraron las meninges y las cortezas fueron disgregadas mecánicamente con unas tijeras y posteriormente con pases sucesivos por una pipeta P1000. Finalmente la suspensión fue pasada por un filtro estéril de 40 µm y sometida a dos lavados mediante de centrifugación (15 min, 4500 rpm) en medio de disección. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo 10% FCS y sembradas en placas de 6 cm de diámetro a una densidad de 5 x 10⁶ células/placa. Las células se mantuvieron durante 3 días en este medio una incubadora. Al cabo de este tiempo, se sustituyó este medio por medio de cultivo con 1% de B27 en lugar de FCS y se permitió la maduración de las células durante 1 semana, antes de someterlas a privación de oxígeno y glucosa.

2.3 Cultivo de astrocitos

El cultivo se realizó de acuerdo al método descrito por Montana et al.(2004). Se utilizaron neonatos de ratas Wistar entre P0-3. Los animales fueron decapitados, se expuso el cerebro y se obtuvo un fragmento de corteza usando pinzas de disección que fue colocado en medio de disección. Se retiraron las meninges y las cortezas fueron disgregadas mecánicamente con unas tijeras y posteriormente con pases sucesivos por una pipeta P1000. Finalmente la suspensión fue pasada por un filtro estéril de 190 µm de diámetro y sometida a dos procesos de lavado por centrifugación en medio de disección (5 min, 4500 rpm). Las células fueron resuspendidas en medio de disección, nuevamente filtradas con un filtro de 40 µm y lavadas dos veces como antes.

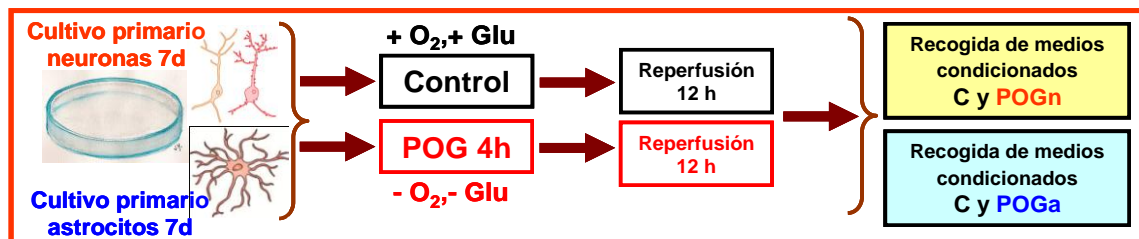
Finalmente las células fueron resuspendidas en medio de cultivo conteniendo 10% de FCS y sembradas en placas de 6 cm de diámetro **sin polilisina** a una densidad de 5×10^6 células/placa. Se les permitió madurar durante tres días y fueron transferidas a medio de cultivo con 1% de B27. Las células maduraron hasta completar una semana en total antes de ser sometidas a privación de oxígeno y glucosa.

2.4 Cultivo de células precursoras neurales (CPNs) de la SVZ

El cultivo de células progenitoras de la SVZ se realizó de acuerdo al método descrito por Agasse et al. (2004). Brevemente, se obtuvieron camadas de rata entre P0-3. Los animales fueron sacrificados por decapitación y los cerebros fueron colocados en medio de disección. Se retiraron las meninges y se procedió a realizar secciones coronales de 500 μm con un chopper. Se disecó la SVZ, se trituró con unas tijeras de disección y se realizó un tratamiento con tripsina al 0,025% durante 10 minutos a 37°C. La reacción fue detenida por centrifugación (1 min, 10000 rpm) y sucesivos lavados en medio de disección. Las células fueron resuspendidas en medio de cultivo con 20 ng/mL de EGF como factor de crecimiento y sembradas en flotación en placas no polilisinadas a una densidad de 3000 células/cm², permitiéndose posteriormente la formación de neuroesferas durante 7-10 días. Éste método evita la adhesión de las células a la placa, por lo que aquellas células que no tengan capacidad proliferativa morirán. Así pues la ausencia de polilisina funciona como mecanismo de selección de células madre. Al cabo de este tiempo inicial, las neuroesferas se sembraron en placas de 6 cm o en cristales de 6 mm de diámetro polilisinados en el mismo medio de cultivo sin factores de crecimiento para iniciar la fase de diferenciación.

2.5 Isquemia experimental “in Vitro”: Modelo de privación de oxígeno y glucosa (POG).

Para los experimentos en los que sometió a las neuroesferas a la acción de medios condicionados procedentes de neuronas o astrocitos, los cultivos de neuronas o astrocitos se sometieron a privación de oxígeno y glucosa (POG). Después de una semana de cultivo se retiró el medio y las células fueron lavadas con medio de disección. Las células control se incubaron en medio DMEM con glucosa y antibiótico en el incubador usual durante 4h. Las células que serían sometidas a POG se incubaron con medio DMEM **sin glucosa** y con antibiótico al 1% durante 4h en una atmósfera de 95% N₂, 5% CO₂ a 37°C en un incubador sellado en el que se controló el burbujeo continuo del gas. Finalizado este período, se retiró el medio de ambas poblaciones celulares (control y POG) se lavaron las células brevemente con medio de disección y se incubaron en medio de cultivo durante 12h. Al terminar el período de reperusión, los medios condicionados fueron recogidos y congelados a -80°C hasta su utilización (Esquema 1).



Esquema 1: Aproximación experimental para la obtención de medios condicionados procedentes de neuronas (POGn) o astrocitos (POGa) sometidos a isquemia experimental.

3. Métodos empleados para la caracterización de la expresión de VGLUTs, EAATs y variables de neurogénesis

La expresión de los VGLUTs fue caracterizada por análisis de la expresión de ARNm mediante RT-qPCR, western blot y por inmunocitoquímica. Los transportadores EAATs y variables de neurogénesis indicadoras del proceso de diferenciación fueron valorados mediante RT-qPCR o inmunocitoquímica de acuerdo a las necesidades experimentales.

3.1 Preparación de las células para los distintos ensayos

3.1.1 Estudios de expresión y neurogénesis.

A) Para la caracterización de la expresión de VGLUTs por western blot, se sembraron 750 esferas en placas polilisinas en un volumen final de 6 mL de medio de cultivo y se les permitió formar colonias durante 3, 7 y 10 días. Al finalizar este período de diferenciación se retiró el medio, se lavaron las células con PBS frío y se recogieron, levantándolas con ayuda de un rascador, en 1 mL de tampón de lisis para proteínas (ver apartado 2.4.5). Los extractos se trataron como se indica en los apartados 3.3.1 y 3.3.2.

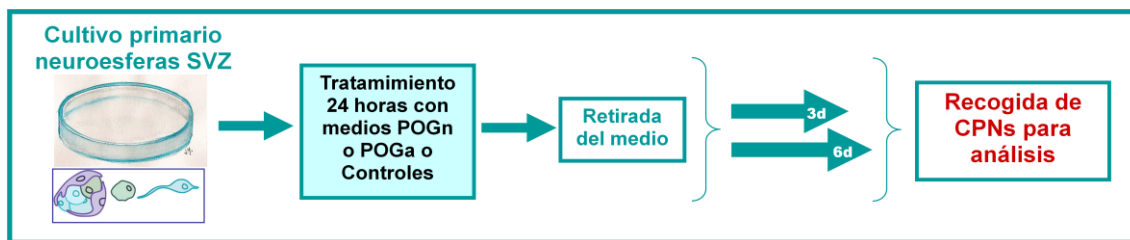
B) Para la caracterización de la expresión de VGLUTs, EAATs y variables de neurogénesis a nivel de ARNm (RT-qPCR), las condiciones de incubación y densidad celular fueron las mismas que para los ensayos de western blot, con la excepción de que se recogieron las colonias de neuroesferas diferenciadas durante 24h, 5, 10 y 15 días. Al finalizar cada tiempo de diferenciación se retiró el medio de cultivo y se recogieron las células con 1 mL de tampón RLT para la extracción del ARNm (ver apartado 3.4.1), guardándose el extracto celular obtenido a -80°C hasta su uso posterior.

C) Para el estudio de expresión de VGLUTs y marcadores de diferenciación en neuroesferas mediante inmunocitoquímica, se sembraron 20-30 esferas por pocillo sobre cristales polilisinas de 6 mm de diámetro en placas P24 en un volumen final de 300µl/pocillo de medio de cultivo. Las células se diferenciaron durante 3 y 7 días. Pasado este tiempo, se retiró el

medio, se lavaron las células en PBS, se fijaron en paraformaldehído al 4%, se lavaron nuevamente en PBS, se sumergieron en tampón crioprotector y se congelaron a -80°C hasta su uso posterior.

3.1.2 Estudio del efecto de la exposición de neuroesferas a medios condicionados obtenidos en células sometidas a POG.

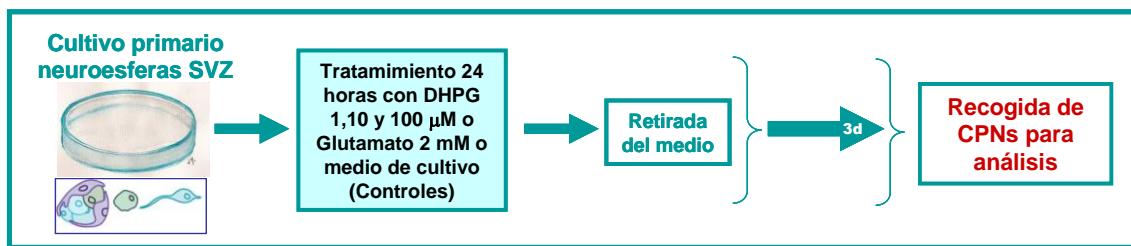
Para determinar el efecto de la exposición de las neuroesferas a medios condicionados por células isquémicas sobre la diferenciación, se sembraron 750 esferas en placas polilisinadas en medio de diferenciación durante 6h para asegurarnos de que las esferas estaban bien adheridas al sustrato. Se retiró el medio y se lavaron las células con 1mL medio de disección. Se añadieron 3mL de medio condicionado durante 24h y pasado este tiempo, se retiró el medio, lavándose de nuevo las células con medio de disección. Posteriormente, las células se dejaron recuperar en medio de cultivo durante 3 o 6 días. Al cabo de este periodo, se retiró el medio y se lisaron las células en 1mL de tampón RLT, conservándose el homogenado celular a -80°C hasta su uso posterior para aislamiento de ARNm y qPCR (Esquema 2).



Esquema 2: Aproximación experimental para la exposición de las CPNs al efecto de medios condicionados procedentes de cultivos de neuronas (POGn) o astrocitos (POGa) sometidos a isquemia experimental.

3.1.3 Estudio del efecto de la activación de receptores metabotrópicos de glutamato.

Para determinar el efecto de la activación del receptor metabotrópico mGluR5 sobre la diferenciación de las neuroesferas y la expresión de los VGLUTs y EAATs, 750 esferas fueron sembradas en placas polilisinadas en un volumen final de 3 mL y expuestas a 1, 10 y 100 μM del agonista DHPG o a glutamato 2 mM durante 24h; permitiéndoles posteriormente recuperarse de este estímulo durante 3 días. A las células control no se les sometió a ningún tratamiento. Se escogieron estos tiempos para evaluar efectos a largo plazo sobre la maduración de las células progenitoras. Una vez concluido el tratamiento el medio fue retirado y las células lisadas en 1mL de tampón RLT y guardadas a -80°C hasta su uso posterior para aislamiento de ARNm y qPCR (Esquema 3).



Esquema 3: Aproximación experimental para la exposición de las CPNs al efecto de agonistas glutamatérgicos.

3.2 Inmunodetecciones

3.2.1 Inmunohistoquímica para microscopía de fluorescencia y confocal

El método de inmunohistoquímica utilizado ha sido el descrito por Ceballos et al. (2009). Brevemente, los cortes de cerebro se lavan en flotación con PBS o PBS-T a temperatura ambiente. Tras bloquear las peroxidasas endógenas con H_2O_2 al 3% durante 15 min, los cortes se lavan nuevamente en PBS-T y se realiza la incubación con los anticuerpos primarios de interés (Tabla I A), en suero normal de cabra (NGS, Vector laboratories) al 1% en PBS-T, manteniéndolos toda la noche a 4°C en agitación suave. Al terminar la incubación con los anticuerpos primarios los cortes se lavan nuevamente en PBS-T y se incuban con los anticuerpos secundarios biotinilados a temperatura ambiente en agitación durante 1h en NGS 5%. Posteriormente, para microscopía óptica, se incuban con solución ABC (Vectastain ABC kit; Vector laboratories) durante 1h a temperatura ambiente y se realiza el revelado mediante reacción con 3,3-**diaminobencidina** tetrahidrocloruro (0,5mg/mL) (DAB; SIGMA) en H_2O_2 al 0,01%. El tiempo de revelado varía de 1 a 7 minutos, dependiendo de la proteína a detectar. Los cortes se montan en portaobjetos gelatinizados, deshidratados en gradiente de alcohol (50%, 70%, 90%, 100%) y se lavan brevemente en xileno antes de ser cubiertos con DEPEX para su análisis al microscopio.

Cuando los cortes se preparan para ser examinados por microscopía de fluorescencia, se elimina el paso de bloqueo de las peroxidasas y se realiza la co-detección de VGLUTs y GFAP con los anticuerpos descritos en la Tabla IB, incubando los anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche y los secundarios y terceras capas durante 1h en oscuridad. Los cortes se montan en portaobjetos sin gelatinizar, cubiertos con solución antiborrado (Prolong antifade kit, Invitrogen) y se guardan a 4°C en oscuridad hasta su análisis. Como control negativo se realizaron las inmunohistoquímicas sin incubar con el anticuerpo primario.

3.2.2 Inmunohistoquímica para microscopía electrónica

Para realizar la inmunodetección por microscopía electrónica los animales se perfundieron con paraformaldehído al 4% y los cerebros se crioprotegieron en sacarosa al 30%. Sin embargo, para evitar alteraciones en la ultraestructura, los cerebros no se

congelaron, sino que los cortes de 30 μm se realizaron inmediatamente en un vibratomo. En esta técnica se omite el bloqueo de peroxidasas endógenas con H_2O_2 y no se utilizan tampones con permeabilizantes como el tritón. Esta técnica se empleó para la inmunodetección de VGLUT1, utilizando las concentraciones de anticuerpos detalladas en la Tabla IA, y siguiendo el mismo procedimiento del apartado anterior. Finalmente se revela utilizando DAB y H_2O_2 tratando de limitar el tiempo de reacción para evitar alteraciones en la ultraestructura.

Finalizada la inmunohistoquímica, el tejido se fija posteriormente con tetróxido de osmio al 1% en tampón fosfato 0,1M y se somete a deshidratación progresiva en gradiente de alcoholes (30%, 10min, 50%, 15 min, 70% 2 x 15 min) seguida de tratamiento con acetato de uranilo al 1% en alcohol de 70% durante 30 min, 90% 2 x 15 min y 100% 2 x 15 min. El tejido es entonces tratado con óxido de propileno durante 30 min y posteriormente con una mezcla de óxido de propileno y durcupan (Durcupan ACM Fluka) al 50%. Finalmente, se retira la mezcla y los cortes se dejan exclusivamente en durcupan durante una noche a temperatura ambiente o durante dos horas en campana de vacío. Por último, los cortes son transferidos a un portaobjetos y cubiertos con un cubreobjetos de acetato y el montaje introducido en una estufa a 55°C durante dos o tres días. Finalizado este período el cubreobjetos se retira para poder examinar la muestra al microscopio.

Una vez seleccionada el área de interés, ésta se recorta del montaje utilizando un escalpelo. La muestra de 1-2 mm^2 aproximadamente es entonces incluida en durcupan e introducida en la estufa a 55°C durante dos días. En este punto se realizan cortes semifinos de 1 μm de grosor para ser examinados al microscopio. Una vez seleccionada la zona de interés los cortes semifinos son incluidos en durcupan e introducidos en la estufa a 55°C durante dos días. Se realizan entonces cortes ultrafinos de 1 nm de grosor que serán examinados al microscopio electrónico.

3.2.3 Inmunocitoquímica

Para realizar la inmunodetección las células se lavaron 3 veces en PBS-T durante 5 min. Posteriormente se incubaron con los anticuerpos primarios apropiados (Tabla IC) en 300 μL de PBS-T durante toda la noche. Al día siguiente las células se lavaron 3 x 5 minutos en PBS-T y se incubaron 1h a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios biotinilados y acoplados a fluorocromos, en oscuridad. Se realizaron 3 lavados más de 5 minutos en PBS-T y se incubaron con estreptavidina acoplada a fluorocromo, en oscuridad durante 1h a temperatura ambiente. Se lavó 3 x 5 min en PBS y se realizó la contratinción con el marcador de núcleos DAPI. Las células se montaron en portaobjetos sin gelatinizar usando medio de montaje con antiborrado (Prolong gold antifade kit, Invitrogen) y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su evaluación al microscopio confocal.

Los fabricantes de los anticuerpos utilizados se reflejan en la Tabla III.

3.2.3.1 Microscopios utilizados:

Las muestras se analizaron en el “**Centro de Microscopía y Citometría**” de la Universidad Complutense, en el **Departamento de Fisiología Animal** de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense o en el **Instituto Cajal** empleando los siguientes instrumentos:

La observación de las preparaciones reveladas con DAB se realizó por microscopía de campo claro en **un microscopio Leica DM LB2** con objetivos 4X, 10X, 20X y 60X. Las imágenes fueron obtenidas con la cámara Leica DFC320 (Leica Microsistemas SA, Barcelona, España).

Microscopio de fluorescencia Axioplan 2 (Zeiss), con cámara CCD de alta resolución.

Microscopio confocal multiespectral Leica TCS-SP2-AOBS con 9 líneas de láser (405-633 nm) y 5 canales de detección (4 multiespectrales +1 transmisión).

Microscopio electrónico Jeon 100 B.

3.3 Western Blot:

3.3.1 Preparación de extractos y medida de proteínas

Las muestras de tejido o células fueron homogeneizadas en tampón de lisis para extracción de proteínas (apartado 2.4.5). El homogenado se agitó lentamente en una noria a 4°C durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se congeló a -80°C hasta su uso.

Las proteínas se valoraron mediante el método de Bradford. Como estándar relativo se preparó una curva patrón de albúmina sérica bovina, y se utilizó el test Bio-Rad Protein Assay, comercializado por Bio-Rad (*Bio-Rad Laboratorios- Hércules, CA, EE.UU.*). Se preparó una curva patrón de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina, y se tomaron volúmenes iguales de proteína para cada una de las muestras. Cada punto de la curva patrón y de las muestras se diluyó en PBS con el fin de obtener volúmenes de muestra iguales, a los que se añadieron idénticas cantidades de Bio-Rad Protein Assay, y se leyó la absorbancia A₅₉₅ en un lector de placa SLT reader 340 ATC (Labinstruments GMBH –Grödig, Salzburgo, Austria).

Tabla I: Descripción de las técnicas de inmunodetección y datos de los anticuerpos utilizados.

A) Inmunohistoquímica						
Anti-cuerpo 1º	Concentración	Anticuerpo 2º	Concentración	Tercera capa	Revelado	Contratación
Rabbit anti VGLUT1	1/500	Goat anti rabbit biotinilado	1/500	Sol. ABC	DAB (0,5 mg/mL en H ₂ O ₂ al 0,01%) 1-7 minutos.	-
Rabbit anti VGLUT2	1/500		1/500			
Rabbit anti VGLUT3	1/300		1/250			
Rabbit anti GFAP	1500		1/500			
B) Inmunofluorescencia en tejido						
Anticuerpo 1º	Concentración	Anticuerpo 2º	Concentración	Tercera capa	Concentración	Contratación
Rabbit anti VGLUT1	1/500 (O/N)	Goat anti rabbit biotinilado	1/500 (1h)	Estreptavidin a-Alexa 488	1/800	DAPI
Rabbit anti VGLUT2	1/500 (O/N)		1/500 (1h)			
Rabbit anti VGLUT3	1/300 (O/N)	Goat anti guinea pig- Cy3	1/250 (1h)		-	
Mouse anti GFAP	1/500 (O/N)	Goat anti mouse-alexa 594/Goat antimouse-alexa 488	1/500 (1h)	-	-	
C) Inmunofluorescencia en células						
Anticuerpo 1º	Concentración	Anticuerpo 2º	Concentración	Tercera capa	Concentración	Contratación
Rabbit anti VGLUT1	1/150 (O/N)	Goat-Antirabbit -atto 488/Donkey	1/200 (1h)	-	-	DAPI
Rabbit anti VGLUT2		ey Antirabbit -Alexa 488				
Rabbit anti VGLUT3						
Mouse anti GFAP	1/250 (O/N)	Goat-Antimouse - Biotinilado	1/250 (1h)	Estreptavidina-Texas red	1/800 (1h)	
Goat anti DCX	1/200	Donkey-antigoat biotinilado	1/200 (1h)			

3.3.2 Western blot

Se tomaron muestras de entre 15-20 µg de proteína que fueron cargadas en tampón Laemmli 1X, calentados a 95°C durante al menos 5 minutos y cargados en geles de poliacrilamida con fase compactadora al 4% (4 % acrilamida, 0,13 % bisacrilamida, 125 mM Tris pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1% persulfato amónico, 0,243 % TEMED) y fase separadora al 10% (10 % acrilamida, 0,625 % bisacrilamida, 375 mM Tris pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1% persulfato amónico, 0,243 % TEMED). La electroforesis se realizó durante 2 horas y media a 100V en tampón de electroforesis y la transferencia a membranas de PVDF (HybondTM- P, Amersham Biosciences Europe GMBH) se prolongó durante 2 horas a 400mA en tampón de transferencia, utilizando el equipo Miniprotean Cell 3 (Bio-Rad laboratories). Las membranas tienen de 0,45 µm de diámetro de poro, fueron activadas previamente por inmersión en metanol durante 30 segundos y tanto éstas como los geles, esponjas y papeles Whatman se equilibraron en el tampón de transferencia. Para mantener baja la temperatura las cubetas fueron introducidas en una caja con hielo. Las membranas fueron bloqueadas en leche desnatada (Sveltesse, Nestlé) al 5% en T-TBS durante 1h a temperatura ambiente y los lavados se realizaron en T-TBS. Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4°C durante toda la noche y los secundarios a temperatura ambiente durante una hora en las condiciones indicadas en la Tabla II. La detección se realizó mediante autoradiografía tras incubar las membranas en ECL kit (Amersham Biosciences Europe GMBH) según las instrucciones del fabricante. La cuantificación de la señal se realizó mediante análisis densitométrico de las autoradiografías comparando el valor de las proteínas de interés con la señal obtenida de la beta-actina, que es utilizada como control de carga. El análisis densitométrico del western blot se llevó a cabo mediante el software Fuji Film Science Lab Image Gauge. La determinación del peso molecular se hizo por comparación con el marcador *Precision plus protein standard dual color*, de Bio-Rad. Los fabricantes de los anticuerpos pueden consultarse en la Tabla III.

Tabla II: Anticuerpos y condiciones utilizadas en las técnicas de western blot.

Western Blot				
Anticuerpo 1º	Concentración	Anticuerpo 2º	Concentración	Revelado
<i>Rabbit anti VGLUT1</i>	1/2000	<i>Goat anti rabbit, goat anti guinea pig o goat antimouse acoplado a peroxidasa de rábano</i>	1/2000	ECL. Amersham.
<i>Rabbit anti VGLUT2</i>				
<i>Rabbit anti VGLUT3</i>				
<i>Guinea pig Anti EAAT1</i>				
<i>Guinea pig Anti EAAT2</i>				
<i>Rabbit anti EAAT3</i>				
<i>Mouse anti Beta actina</i>				

Tabla III: Fabricantes de los diferentes anticuerpos utilizados en este estudio.

<i>Fabricantes de anticuerpos</i>		
<i>Anticuerpo</i>	<i>Tipo</i>	<i>Casa comercial</i>
<i>Rabbit anti Vglut1</i>	<i>Primario</i>	<i>Santa Cruz biotechnologies</i>
<i>Rabbit anti Vglut2</i>		
<i>Rabbit anti Vglut3</i>		
<i>Rabbit anti EAAT1</i>		
<i>Rabbit anti EAAT2</i>		
<i>Rabbit anti EAAT3</i>		
<i>Goat anti DCX</i>		<i>SIGMA</i>
<i>Rabbit antiGFAP</i>		
<i>Mouse anti GFAP</i>		
<i>Goat anti rabbit Biot</i>	<i>Secundario</i>	<i>Santa Cruz biotechnologies</i>
<i>Donkey anti goat Biot</i>		<i>Invitrogen</i>
<i>Donkey antirabbit- alexa 488</i>		
<i>Goat anti rabbit atto 488</i>		<i>SIGMA</i>
<i>Goat antimouse biot</i>		<i>Santa Cruz biotechnologies</i>
<i>Goat antimouse- alexa 488</i>		<i>Invitrogen</i>
<i>Goat antimouse- Alexa 594</i>		

3.4 Técnicas de RT-qPCR:

3.4.1 Extracción de ARNm:

Para extraer el ARNm de muestras de corteza y caudado-putamen cada hemisferio fue colocado en un mortero preenfriado con nieve carbónica. Con ayuda de una cuchilla se seccionó la corteza prefrontal hasta exponer el caudado putamen aproximadamente a +2,28mm de bregma y se realizó otro corte más posterior aproximadamente a 0,60 respecto a bregma de acuerdo con el atlas de cerebro de rata de Paxinos and Watson. De esta manera se obtiene una sección que contuviera la corteza y caudado putamen correspondientes al área lesionada. Cada fragmento de corteza y caudado-putamen fue pulverizado con el émbolo del mortero y finalmente disuelto en 1 mL de TRIZOL (TRIZOL reagent, Invitrogen). La solución se pasó 15 veces por una jeringa de 1 mL con una aguja de 21g para romper completamente las membranas y posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a $12000 \times g$ a 4°C . Se recogió el sobrenadante y se añadieron 200 μL de cloroformo, se agitó en un vórtex durante 5 segundos y

se dejó incubar la mezcla durante 3 minutos. Posteriormente se centrifugó durante 10 minutos a 4°C para separar la fase acuosa de la orgánica, la cual fue traspasada a una columna de extracción de ARNm.

El ARNm de las muestras de células en tampón RLT y las muestras de tejido en fase acuosa producto de la extracción con TRIZOL, se extrajo mediante las columnas del kit RNeasy (QIAGEN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evitar la contaminación con ADN genómico se realizó un tratamiento adicional con 10 µL (27 unidades) de DNAsa I (QIAGEN) durante 10-15 minutos a temperatura ambiente.

La concentración de ARNm fue medida por espectrofotometría a 260nm. La pureza de las muestras fue determinada calculando la ratio abs260/280. Se seleccionaron muestras con una ratio aproximada a 2. El ARNm total fue resuspendido en agua libre de RNAsas suministrada en el kit de extracción.

3.4.2 Retrotranscripción (RT)

La transcripción reversa, se llevó a cabo durante 1 hora a 55°C con primer oligodeoxitimidilato en un volumen final de 20 µl, usando 1 µg de RNA total, 10U de transcriptasa reversa SuperScript III, 500 ng oligo(dT)12–18 y 1 mM de la mezcla de dNTP mix, para cada RT, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un Eppendorf Mastercycler personal thermal cycler. Los materiales utilizados en la retrotranscripción fueron obtenidos de Invitrogen. Todas las disoluciones fueron preparadas en agua DEPC.

3.4.3 PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

El ensayo de qPCR se llevó a cabo en un termociclador ABI Prism 7700 en un volumen final de 10 µl. Para detectar los productos de qPCR de las muestras de cDNA obtenidas por transcripción reversa se empleó SYBR Green PCR Master Mix (Roche), usando 1,5 µl of cDNA molde, correspondiente a 1µg de RNA total en un volumen final de 20 µl, y 0,3 µM de cada primer (10 µM). Las condiciones de qPCR fueron: 95°C (10 min) seguida de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y anillamiento (annealing) durante 1 minuto a 60°C. Para cada gen de interés y gen housekeeping, se realizaron 2-4 ensayos de qPCR independientes, cada uno de ellos medido por triplicado. Para cada ensayo de qPCR se realizó además un no-template control (NTC), y la medida de la contaminación del DNA genómico del RNA total se realizó usando muestras RT- (muestras sin transcripción reversa). Todas las disoluciones fueron preparadas en agua DEPC. Los resultados se presentan como RQ calculadas a partir de las Cts de cada gen de estudio y gen control mediante la fórmula:

$RQ=2^{-\Delta(\Delta Ct)}, \text{ donde } \Delta(\Delta Ct)=\Delta Ct(\text{gen interés})-\Delta Ct(\text{control})$

3.4.4 Diseño de primers:

Se realizó a partir de las secuencias alineadas para los distintos genes objeto de estudio obtenidas de la base de datos GeneBank. Las secuencias consenso resultantes se utilizaron como molde. Los primers se diseñaron usando el “Primer BLAST” de Pubmed y se seleccionaron tras la evaluación del software y subsiguiente chequeo en BLAST (<http://www.ncbi.nih.gov>). Por último, se realizó una puesta a punto de la eficiencia de los primers utilizando diluciones seriadas de ARNm 1/10, 1/100 y 1/1000 por triplicado. En estas condiciones la pendiente de la ecuación de la recta debe dar un valor aproximado a -3,4 y un coeficiente de regresión r^2 superior a 0,9. Sólo se seleccionaron los primers que cumplieran estos requisitos. En la Imagen 17 se muestran los resultados de expresión de ARNm el primer para β -actina como ejemplo de validación de los primers. Los primers seleccionados se pueden ver en la Tabla IV. El gen β -actina fue utilizado como gen de referencia (housekeeping). Los primers se sintetizaron por Sigma-Aldrich Co.

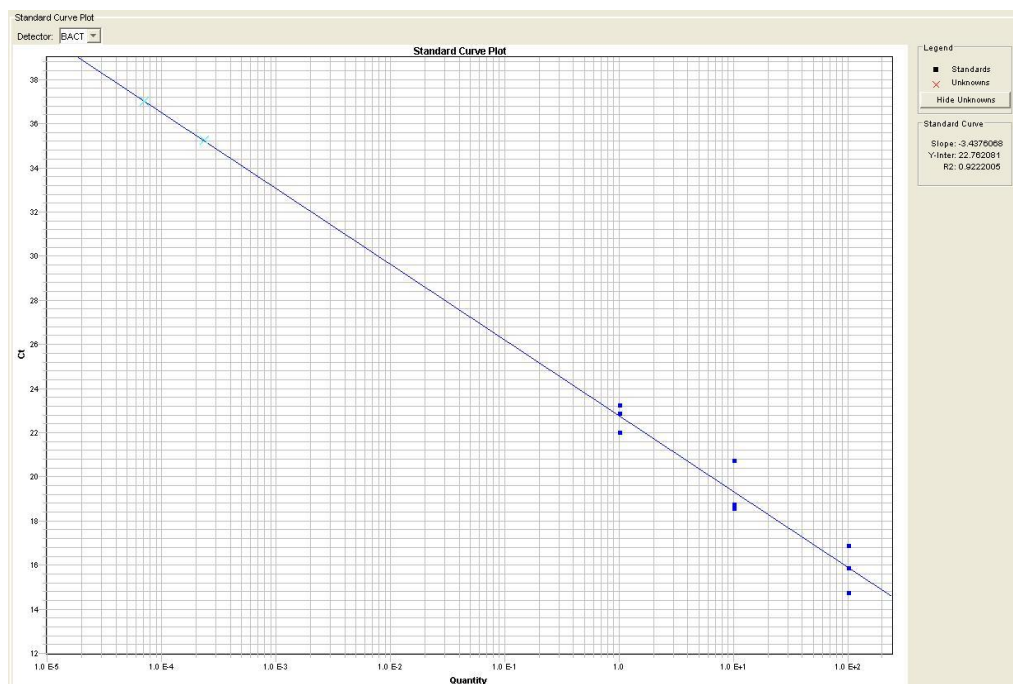


Imagen 17: Ejemplo significativo de la puesta a punto de primers. Se realizó una RT-qPCR en diluciones seriadas del material de partida 1/10, 1/100 y 1/1000. Esperamos obtener una diferencia de aproximadamente 3,5 ciclos en el tiempo de Ct de cada una. La pendiente de la recta es -3,43 indicando que efectivamente hay una diferencia aproximada de 3,5 ciclos entre muestras. El valor del coeficiente de regresión lineal es $r^2=0,92$, por lo que los triplicados están hechos de forma precisa. El resultado indica que este primer es adecuado para el estudio a realizar.

Tabla IV. Primers utilizados en el estudio.

	Gen	Primer 5'→3'		Product lenght	pb	%GC	Tm	Código NM
Transportadores de glutamato	VGLUT1	Fwd	GCTGTGTCATCTTCGTGAGG	110	20	55	52,99	NM_053859.1
		Rev	CAGCCGACTCCGTTCTAAGG		20	60	54,48	
	VGLUT2	Fwd	TGGTGCAGTACACTGGATGG	123	20	55	53,82	NM_053427.1
		Rev	CGTCTGTTATGGTTGGATGC		20	50	51,23	
	VGLUT3	Fwd	GCAATGACAAAGCACAAGACC	108	21	47,6	52,91	NM_153725.1
		Rev	TTCCCCAGAAGCAAAGACC		19	52,6	51,42	
	EAAT1	Fwd	TGCTTCTCTCCATGTGCTTCG	109	20	64,2	52,19	NM_019225.1
		Rev	CGCTACCAATCTCATGATGG		20	58,3	50,4	
	EAAT2	Fwd	ATTGGTGCAGCCAGTAGGCC	100	20	50	63,8	NM_017215
		Rev	TTCTATCCAGCAGCCAGTCC		20	55	64,3	
	EAAT3	Fwd	CAAGCGTGAAGAAGTGAAGC	137	20	50	52,1	NM_013032.3
		Rev	TGATGCCGTCTGAGTACAGG		20	55	53,39	
Neurogénesis	DCX	Fwd	AGGTAACGACCAAGACGCAAATGG	91	24	50	57,73	NM_053379.2
		Rev	AGGGCTTGTTGGGTGTAGAGATAGG		24	54,17	57,17	
	NCAM	Fwd	GCCGGCAGTTTACAATGCTGCG	112	22	59,09	59,87	NM_031521.1
		Rev	ACGCTGATTCTCCTTGCTGGG		23	56,62	59,19	
	Beta 3 tubulina	Fwd	GTGAAGTCAGCATGAGGGAGATCG	119	24	54,17	57,16	NM_139254.2
		Rev	ATAGTTGCCGCTGGGGTCTATGCC		24	58,33	60,65	
	Nestina	Fwd	TACATACAGGACTCTGCTGGAGGC	108	24	54,17	57,5	NM_012987.1
		Rev	AGGAAATTCGGCTTCAGCTGGGG		24	54,17	59,46	
	GFAP	Fwd	GCTCCAAGATGAAACCAACC	119	20	50	51,24	NM_017009.2
		Rev	CCAGCGACTCAACCTTCCT		20	57,89	53,53	
	SOX 2	Fwd	ATCACAACAATCGCGGCGGC	70	20	60	58,96	NM_001109181.1
		Rev	AGACGGGCGAAGTGCAATTGGG		22	59,09	59,99	
	TLX	Fwd	TTCTTCACAGCGGTCACGCAGC	85	22	59,09	60,24	NM_001113197.1
		Rev	TCACGAGAGTCTGCCGTTTACAGG		22	59,09	58,35	
Control	rBACT	Fwd	GCCAACCGTGAAAAGATGA	103	19	47,3	63,7	NM_031144.2
		Rev	TACGACCAGAGGCATACAGG		20	55	67,4	

3.5 Soluciones y tampones utilizados:

Los medios, tampones y soluciones utilizados fueron preparados con sales de Merck Farma y Química, S.A. (Barcelona, España) de grado analítico, agua desionizada y bidestilada. El sistema de purificación de agua fue Millipore MILLI-Q PLUS ZFMQ05001 (calidad > 18,2 Ω).

- 1) **Tampón crioprotector:** Etilenglicol 30%, Glicerol 30% en tampón fosfato 0,1M pH 7,2.
- 2) **Tampón fosfato salino (PBS-10X):** Na₂HPO₄ 171,4mM, KH₂PO₄ 20,8 mM, NaCl 1,730M pH = 7,4 . Para utilizarlo se diluye a 1X. Para permeabilizar las células o el tejido durante las inmunodetecciones se adiciona 1mL de Tritón/litro (PBS-T).
- 3) **Tampón Tris clorhídrico 0,1M (TBS-10X):** Se disuelven 12,114g Tris, 58,44g NaCl, pH 8 en 1 litro de agua destilada. La solución 10X es diluida a 1X en agua destilada para su utilización. Para

el lavado de membranas se adiciona 1mL de Tween/litro (T-TBS).

- 4) **Tampón de lisis para extracción de proteínas:** Tritón 1%, Tris 10mM, EDTA 5mM, NaCl 50mM, pirofosfato sódico 30mM, fluoruro sódico 50mM, ortovanadato 100uM, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 500uM, aprotinina 5ug/uL, leupeptina 0,025 ug/uL, pH 7,4. PMSF, aprotinina, leupeptina y DTT se compraron a Sigma-Aldrich Química (Madrid, España).
- 5) **Tampón Laemmli 4X:** Tris-HCl 200 mM, 10% Glicerol, 6% SDS, 4% β -mercaptoetanol, 2 mM EDTA, 0,02 % azul de bromofenol, pH 6,8.
- 6) **Tampón de electroforesis (10X):** Tris 250mM, glicina 2,5 M, SDS1%. pH = 8,3
- 7) **Tampón de transferencia:** Tris 66mM, glicina 386mM, 1% SDS, 20% metanol (v/v).

3.6 Método estadístico y expresión de resultados

Los resultados corresponden a grupos de entre 3 y 6 ratas, en las cuales se realizaron los experimentos por duplicado o triplicado. Para los experimentos hechos en células cada experimento se repitió dos veces y cada uno fue evaluado por duplicado (western blot) o triplicado (RT-qPCR). Antes de realizar las comparaciones estadísticas se analizaron los datos para determinar si siguen una distribución normal y son equivariantes. La comparación estadística entre hemisferios normal e isquémico se realizó mediante el test t de Student o mediante la prueba de Mann Whitney para los datos no paramétricos. La comparación estadística para los experimentos con células se realizó mediante ANOVA de una vía seguida del test de Tukey para conocer la significación estadística entre las diferentes condiciones experimentales. Los valores representados en las figuras corresponden a la media \pm S.E.M de los valores experimentales obtenidos o a la mediana \pm min,max en el caso de variables no paramétricas. Las diferencias se aceptaron como significativas para una $P < 0,05$ o menor.

IV. Resultados

IV. RESULTADOS:

1. Estudio de la expresión de transportadores de glutamato vesiculares y de membrana en ratas isquémicas

1.1 Estudio de la expresión de VGLUTs y EAATs mediante inmunohistoquímica.

1.1.1 Caracterización del proceso de isquemia focal transitoria (tMCAO) por oclusión de la ACM mediante ligadura

La caracterización del área de lesión después de la t-MCAO realizada por oclusión de la ACM, mediante el método de filamento intraluminal, se confirmó mediante la tinción de Nissl en distintos cortes cerebrales. Se observó que la zona infartada se extiende a lo largo de la corteza somatosensorial y el caudado putamen (Figura 1A). Sin embargo el método de ligadura de la arteria cerebral media produce una lesión concentrada en la corteza somato sensorial (Sobrado et al., 2011) (Figura 1B).

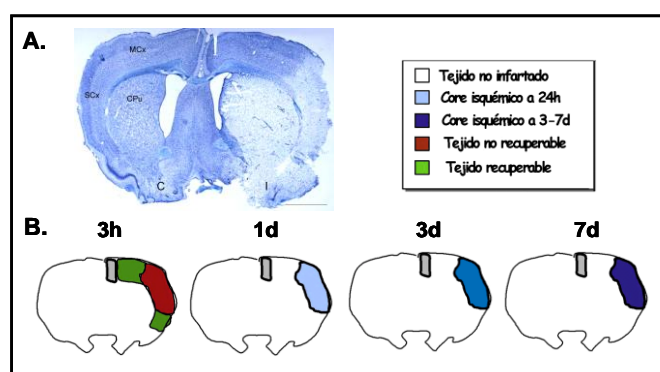


Figura 1: A) Tinción de Nissl de una sección coronal de hemisferios cerebrales contralateral (C) e ipsilateral (I) de una rata sometida a t-MCAO de 3 días de perfusión. La isquemia daña la estructura del hemisferio ipsilateral y el infarto resultante se extiende a través de la corteza somatosensorial, cuerpo calloso y caudado-putamen. Barra de escala: 2 mm. MCx = Corteza motora, SCx = Corteza somatosensorial, CPu = caudado-putamen. B) Dibujo mostrando la evolución de la zona infartada por el método de ligadura de la arteria cerebral media a los diferentes días abordados en este estudio. Adaptado de Sobrado et al. (2011).

1.1.2 El patrón de expresión de VGLUTs se altera por la t-MCAO en la corteza cerebral y en el caudado-putamen

El análisis macroscópico por inmunohistoquímica (4X) reveló que la operación nula o “sham” no indujo cambios en el patrón de expresión de ningún transportador en la corteza (Figura 2) ni del caudado putamen (Figura 3), presentando ésta la distribución normal descrita por (Fujiyama et al., 2001; Herzog et al., 2004; Herzog, 2006).

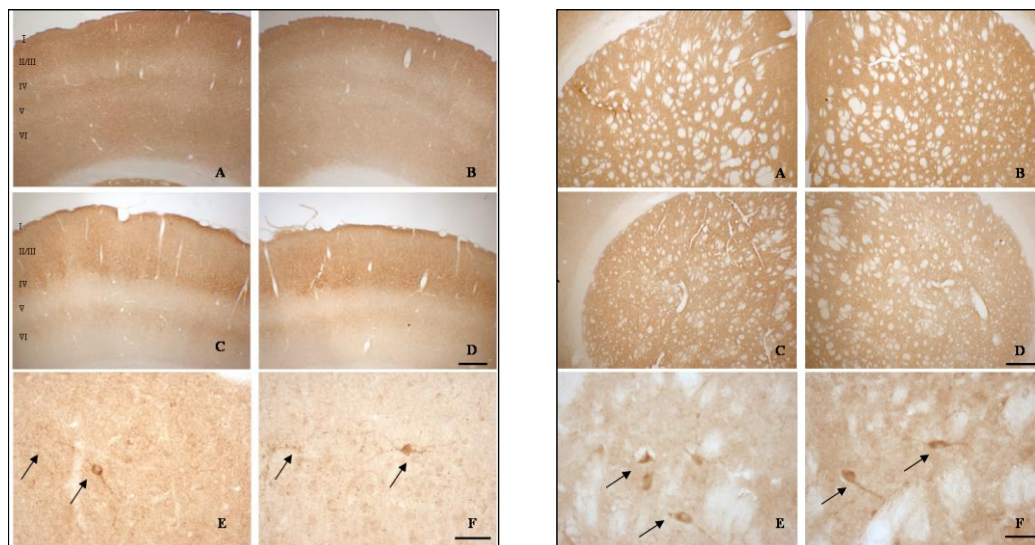


Figura 2 (izquierda): La operación “sham” no indujo ninguna alteración significativa en el nivel de expresión de los diferentes VGLUTs en la corteza. **A, C, E:** Expresión de VGLUT1, 2 y 3 en la corteza del hemisferio no operado. **B, D, F:** Expresión de VGLUT1, 2 y 3 en la corteza del hemisferio expuesto a la cirugía sin oclusión de la ACM. Barra de escala **A-D:** 50 μm. **E, F:** 20 μm. Los números romanos detallan las capas corticales.

Figura 3: (derecha) La operación “sham” no indujo ninguna alteración significativa en el nivel de expresión de los diferentes VGLUTs en el caudado putamen. La expresión de VGLUTs permaneció inalterada en el caudado putamen de las ratas sham, tras 3 días de reperusión. **A, C, E:** Expresión de VGLUT1, 2 y 3 en el caudado putamen del hemisferio contralateral. **B, D, F:** Expresión de VGLUT1, 2 y 3 en el caudado putamen del hemisferio ipsilateral. Barra de escala **A-D:** 50 μm. **E, F:** 10 μm. EF Neuronas (flechas) marcadas para VGLUT3 en el caudado putamen.

La aplicación de la isquemia transitoria de la ACM reveló, mediante esta técnica, un incremento de VGLUT1 en todas las capas corticales, especialmente en la II, IV y VI en comparación con el hemisferio control tras 72h de reperusión (Figura 4). De igual modo ocurre en el caudado putamen, en donde se detecta un incremento de VGLUT1 en la región dorsolateral (Figura 6). Por el contrario, VGLUT2 disminuye drásticamente tanto en las capas III y V de la corteza (Figura 4) y en la región dorsolateral del caudado-putamen (Figura 6). Por último, en la capa II de la corteza isquémica desaparecen somas y dendritas marcados con VGLUT3 en comparación con el hemisferio control (Figura 5), mientras que en el caudado-putamen se aprecia una pérdida general de somas marcados para este transportador (Figura 6). Los resultados fueron confirmados realizando un control negativo en el que se eliminó el anticuerpo primario de la mezcla de incubación de anticuerpos (Figura 7).

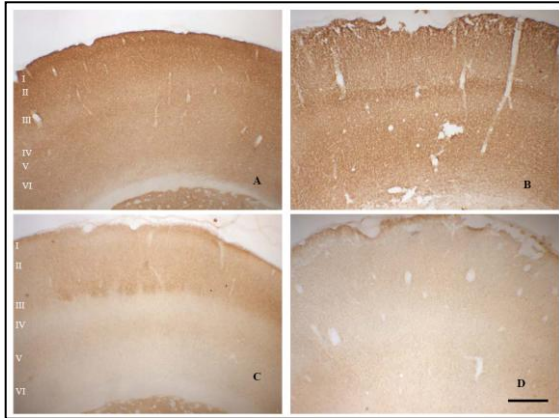


Figura 4: La isquemia induce un incremento en la expresión de VGLUT1 y una disminución de la expresión de VGLUT2 y 3 en corteza. **A, C, E:** VGLUT1, 2 y 3, respectivamente, en la corteza del hemisferio control. **B, D, F:** VGLUT1, 2 y 3, respectivamente, en la corteza del hemisferio isquémico. **A-D:** 50µm. Los números romanos detallan las capas corticales.

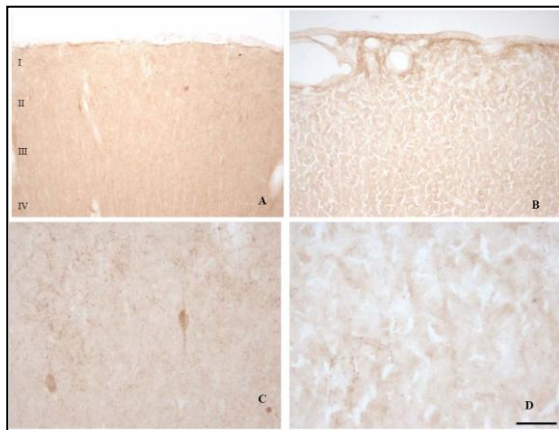


Figura 5: La isquemia induce una disminución de la expresión de VGLUT3 en la capa II de la corteza. **A y B:** VGLUT3 en la corteza normal e isquémica respectivamente a bajo aumento. **C y D:** Detalle de la capa II normal e isquémica respectivamente. Se observa una pérdida de somas neuronales y una disminución de las dendritas marcadas con el transportador. Barra de escala: **A y B:** 20 µm. **C y D:** 10 µm. Los números romanos detallan las capas corticales.

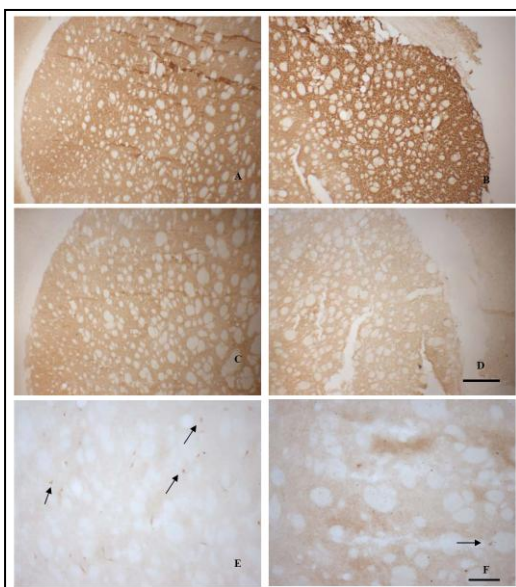


Figura 6: La isquemia induce un incremento en la expresión de VGLUT1 y una disminución de la expresión de VGLUT2, así como la desaparición de células marcadas con VGLUT3 (flechas) en CPu. **A, C, E:** VGLUT1, 2 y 3, respectivamente, en el CPU control. **B, D, F:** VGLUT1, 2 y 3 respectivamente en el hemisferio isquémico. **A-D:** 50 µm; **E, F:** 10 µm.

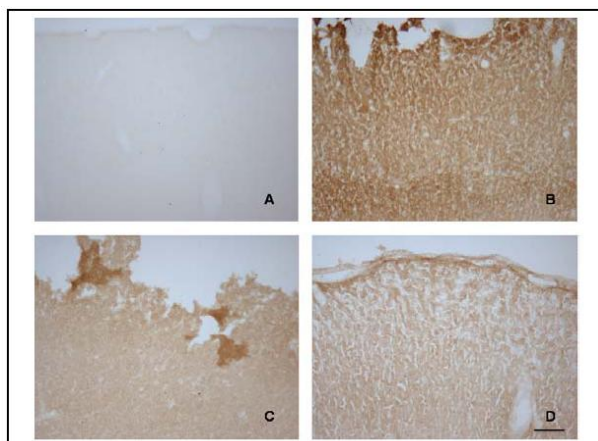


Figura 7: Los anticuerpos secundarios para anti-rabbit no generan señal inespecífica en el hemisferio isquémico. El control negativo se realizó eliminando los anticuerpos primarios de VGLUTs pero añadiendo el anticuerpo secundario. A) El corte no genera precipitado de DAB al incubar con el anticuerpo secundario únicamente. B-D) VGLUT1-3 respectivamente en el hemisferio isquémico. Barra de escala: 20µm.

1.2 Caracterización de la expresión de los transportadores vesiculares y de membrana de glutamato mediante Western-blot

Habiendo observado las alteraciones que se producen en los niveles de los distintos transportadores vesiculares a los 3 días de reperfusión, decidimos evaluar dichos cambios mediante western blot a 24h, 72h y 7 días de reperfusión para determinar cómo varía su expresión en este curso temporal tras la isquemia, tanto en corteza como en caudado-putamen. Así mismo, evaluamos los cambios en la expresión de los transportadores de membrana EAAT 1, 2 y 3, debido al importante papel que juegan en la regulación de los niveles extracelulares de glutamato.

1.2.1 Alteraciones en la expresión de VGLUTs en la corteza y caudado-putamen.

En la corteza la expresión de VGLUT1 no mostró cambios significativos a 24h de reperfusión. Sin embargo a 72h se observó un incremento de aproximadamente un 50% respecto al hemisferio normal. Por el contrario, 7 días después de la reperfusión se apreció una drástica disminución del transportador de aproximadamente 40% respecto al hemisferio control. Por otro lado, tanto VGLUT2 como VGLUT3, muestran una disminución del 50% en el hemisferio isquémico en comparación con el hemisferio control que se mantiene a lo largo de todos los puntos temporales estudiados (Figura 8; Tabla 1).

En el caudado-putamen la expresión de VGLUT1 mostró un incremento de aproximadamente un 20% 24h después de la reperfusión, que fue reduciéndose hasta alcanzar un 50% menos de señal respecto al hemisferio normal a los 7 días. La expresión de VGLUT2 y VGLUT3 mostró una disminución significativa del 20%, a 72h y 7 días después de la reperfusión, respecto al hemisferio normal (Figura 8; Tabla 1).

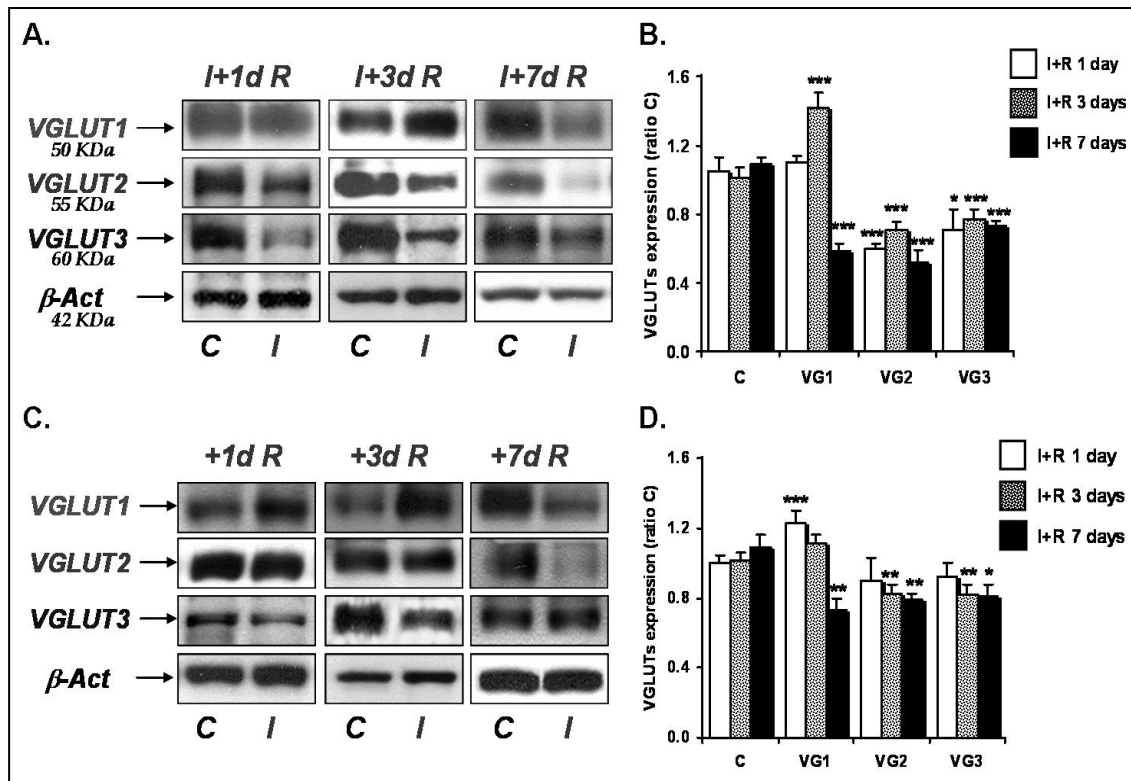


Figura 8: Curso temporal de la expresión de VGLUTs en la isquemia focal transitoria a 1, 3 y 7 días de reperusión. **A y C:** Imágenes representativas de los experimentos de western blot de los hemisferios contralateral (C) e ipsilateral (I) de la corteza cerebral (A) y caudado putamen (B), de las ratas sometidas a isquemia focal transitoria, seguida de 1,3 y 7 días de reperusión. **C y D:** Análisis semicuantitativo de la expresión de los transportadores VGLUTs en corteza (C) y caudado-putamen (D). Los datos representan las ratios de los valores densitométricos entre los hemisferios ipsilateral y contralateral, normalizados con β -actina y se expresan como medias \pm SEM de los valores obtenidos de 5 ratas, en las cuales cada medida se realizó por duplicado o triplicado. La estadística compara el efecto de la isquemia (I) sobre los valores control (C). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; Student's t-test). Tomado de Sanchez-Mendoza, et al. (2010).

Tabla 1. Expresión de los transportadores de glutamato VGLUTs en la Corteza y Caudado-Putamen en la isquemia focal transitoria (t-MCAO).

A) VGLUTs (Corteza)	Expresión (Media \pm SEM)	B) VGLUTs (CPu)	Expresión (Media \pm SEM)
Reperusión 1 día		Reperusión 1 día	
Control	1,05 \pm 0,08	Control	1,00 \pm 0,05
VGLUT1	1,10 \pm 0,04 ns	VGLUT1	1,23 \pm 0,07***
VGLUT2	0,60 \pm 0,03***	VGLUT2	0,90 \pm 0,13ns
VGLUT3	0,71 \pm 0,12*	VGLUT3	0,92 \pm 0,08ns
Reperusión 3 días		Reperusión 3 días	
Control	1,01 \pm 0,06	Control	1,02 \pm 0,04
VGLUT1	1,42 \pm 0,09***	VGLUT1	1,11 \pm 0,05ns
VGLUT2	0,71 \pm 0,04***	VGLUT2	0,83 \pm 0,05**
VGLUT3	0,77 \pm 0,06***	VGLUT3	0,82 \pm 0,06**
Reperusión 7 días		Reperusión 7 días	
Control	1,09 \pm 0,04	Control	1,09 \pm 0,06
VGLUT1	0,58 \pm 0,05***	VGLUT1	0,73 \pm 0,07**
VGLUT2	0,52 \pm 0,07***	VGLUT2	0,79 \pm 0,04**
VGLUT3	0,73 \pm 0,03***	VGLUT3	0,81 \pm 0,07*

Los datos representan las ratios obtenidas de las medidas densitométricas realizadas en el hemisferio isquémico (I) frente al normal (N), normalizadas con β -actina, y son las medias \pm SEM de los valores obtenidos para 5 ratas en las que cada medida se repitió de 2 a 4 veces. Los controles representan las medias \pm SEM de las variaciones obtenidas para la β -actina en los hemisferios normal e isquémico a los distintos tiempos de reperusión. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test t de Student (ns = no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

1.2.2 Alteraciones en la expresión de EAATs en la corteza y caudado-putamen.

Los transportadores de membrana presentaron modificaciones en la expresión a nivel de proteína muy distintas a las encontradas para los VGLUTs. En la corteza la expresión de EAAT1 mostró una disminución transitoria a 24h de reperusión que se recuperó a las 72h. Sin embargo, 7 días después de la reperusión se observó una disminución del 40% respecto al hemisferio normal ($P < 0,001$). Por otro lado la expresión de EAAT2 mostró una reducción del 10-20% en los tres primeros días, que tendió a recuperarse a los 7 días de reperusión ($P < 0,001$), sin llegar a alcanzar nuevamente el nivel del hemisferio normal (Figura 9; Tabla 2). Por último, la expresión de EAAT3 mostró un leve incremento en la corteza no significativo a 24h de reperusión y una reducción de aproximadamente un 20% a 3 y 7 días de reperusión ($P < 0,01$).

En el caudado-putamen la expresión de EAAT1 muestra una reducción del 50% a los tres días que se mantiene constante hasta el final del experimento. Por el

contrario, la de EAAT2 muestra un incremento significativo del 25% 24h después de la reperfusion y una posterior reducción al 50% del control a los 3 días y al 40% a los 7 días de reperfusion (Figura 9; Tabla 2). Por último, la expresión de EAAT3 no mostró alteraciones significativas en esta estructura.

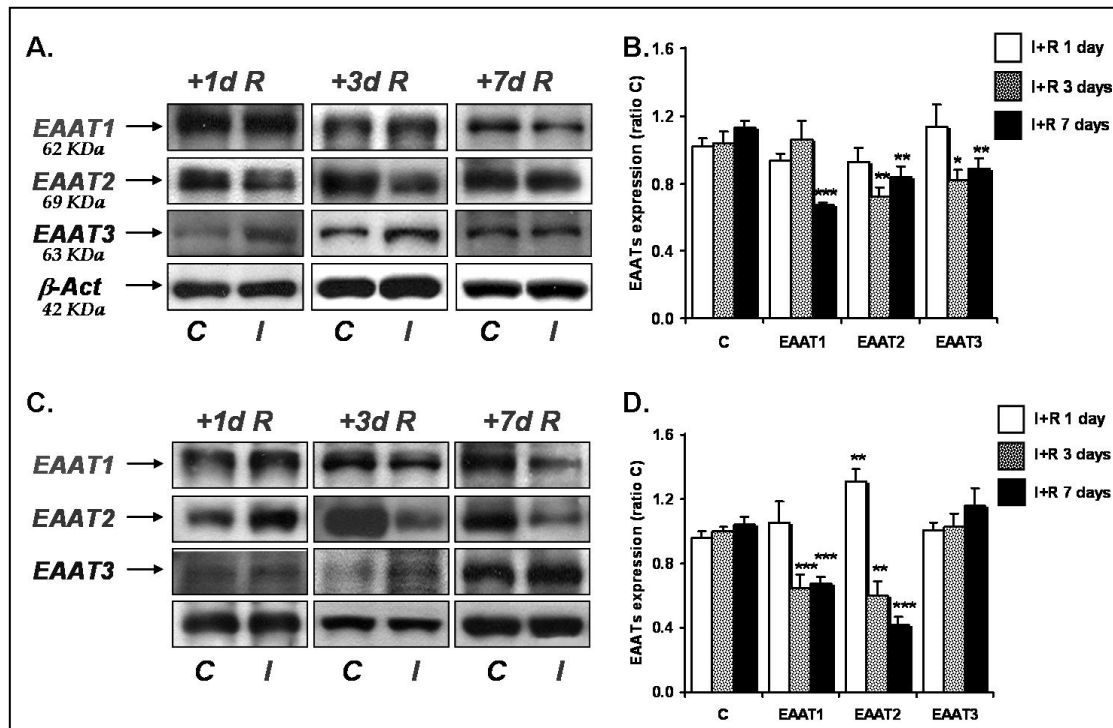


Figura 9: Curso temporal de la expresión de EAATs en la isquemia focal transitoria a 1, 3 y 7 días de reperfusion. A y C: Imágenes representativas de los experimentos de western blot de los hemisferios contralateral (C) e ipsilateral (I) de la corteza cerebral (A) y caudado putamen (B), de las ratas sometidas a isquemia focal transitoria, seguida de 1,3 y 7 días de reperfusion. C y D: Análisis semicuantitativo de la expresión de los transportadores EAATs en corteza (C) y caudado-putamen (D). Los datos representan las ratios de los valores densitométricos entre los hemisferios ipsilateral y contralateral, normalizados con β-actina y se expresan como medias±SEM de los valores obtenidos de 5 ratas, en las cuales cada medida se realizó por duplicado o triplicado. La estadística compara el efecto de la isquemia (I) sobre los valores control (C). (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; Student's t-test). Tomado de Sanchez-Mendoza, et al. (2010).

Tabla 2. Expresión de los transportadores de los glutamato EAATs en la Corteza y Cuadado-Putámen en la isquemia focal transitoria (t-MCAO).

A) EAATs (Corteza)	Expresión (Media \pm SEM)	B) EAATs (CPu)	Expresión (Media \pm SEM)
Reperusión 1 día		Reperusión 1 día	
Control	1,05 \pm 0,08	Control	1,00 \pm 0,05
EAAT1	0,94 \pm 0,04*	EAAT1	1,06 \pm 0,16ns
EAAT2	0,93 \pm 0,08*	EAAT2	1,31 \pm 0,08***
EAAT3	1,14 \pm 0,13	EAAT3	1,01 \pm 0,05
Reperusión 3 días		Reperusión 3 días	
Control	1,01 \pm 0,06	Control	1,02 \pm 0,04
EAAT1	1,06 \pm 0,11ns	EAAT1	0,76 \pm 0,03***
EAAT2	0,72 \pm 0,06***	EAAT2	0,60 \pm 0,09***
EAAT3	0,82 \pm 0,06*	EAAT3	1,03 \pm 0,08
Reperusión 7 días		Reperusión 7 días	
Control	1,09 \pm 0,04	Control	1,09 \pm 0,06
EAAT1	0,67 \pm 0,02***	EAAT1	0,68 \pm 0,04***
EAAT2	0,84 \pm 0,06**	EAAT2	0,42 \pm 0,05***
EAAT3	0,89 \pm 0,06**	EAAT3	1,16 \pm 0,11

Los datos representan las ratios obtenidas de las medidas densitométricas realizadas en el hemisferio isquémico (I) frente al normal (N), normalizadas con β -actina, y son las medias \pm SEM de los valores obtenidos para 5 ratas en las que cada medida se repitió de 2 a 4 veces. Los controles representan las medias \pm SEM de las variaciones obtenidas para la β -actina en los hemisferios normal e isquémico a los distintos tiempos de reperusión. Las comparaciones estadísticas se realizaron mediante el test t de Student (ns = no significativo; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

1.2.3 Correlaciones entre los cambios observados en la expresión de VGLUTs y EAATs con el daño neurológico

El deterioro neurológico se evaluó como 0 en las ratas sham y presentó alteraciones estadísticamente significativas en los animales sometidos a isquemia, que fueron dependientes del tiempo de reperusión post-isquemia. Así, observamos un incremento significativo en la puntuación neurológica de los animales a las 24h de reperusión ($3,33 \pm 0,88$; $P < 0,01$ ANOVA de una vía) que se redujo a 3 días ($2,17 \pm 0,44$) sin presentar cambios a 7 días ($2,33 \pm 0,33$) (Figura 10a).

Las alteraciones observadas en la expresión de los transportadores de glutamato, VGLUTs y EAATs, mostraron correlaciones distintas con el deterioro neurológico de las ratas isquémicas. En la corteza, la expresión de VGLUT1 no mostró una correlación significativa con el deterioro neurológico cuando se analizaron todos los tiempos de reperusión en conjunto (Figura 10b). Esto es debido a que se observó una correlación positiva a 3 días de reperusión ($r = 0,65$; $P < 0,05$), pero una correlación negativa a 7 días de reperusión ($r = -0,97$; $P < 0,001$). Sin embargo, al analizar la expresión

de VGLUT1 entre 1 y 3 días de reperfusion en relación con el daño, observamos una correlación positiva para puntuaciones neurológicas entre 1 y 3 que tiende a desaparecer para puntuaciones neurológicas superiores (Figura 10c). En contraste con VGLUT1, la expresión de VGLUT2 y 3 mostraron una clara correlación negativa con el daño neurológico ($P<0,05$ y $P<0,01$ respectivamente) (Figura 10d-e).

En el caso de los EAATs, no obtuvimos una correlación clara entre los valores de expresión y los valores de deterioro neurológico debido a la diferente significación de los datos obtenidos a los distintos tiempos de reperfusion (Figura 10f-h).

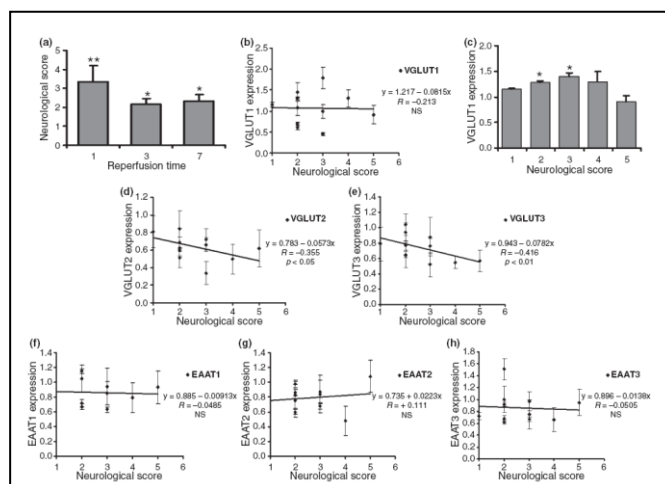


Figura 10: Correlaciones entre los cambios en la expresión de VGLUTs y EAATs con el deterioro neurológico en la corteza cerebral de ratas isquémicas. a) Deterioro neurológico (media ± SEM) de ratas sometidas a tMCAO a diferentes tiempos de reperfusion. (b,d-h) Regresión lineal de la correlación entre el daño neurológico y la expresión de VGLUT1 (b), VGLUT2 (d) y VGLUT3 (e), EAAT1(f), EAAT2(g) y EAAT3(h) medidas por western blot. Se indica la ecuación de la recta, coeficiente de correlación (r) y significación estadística. c) Expresión de VGLUT1 a diferentes valores de deterioro neurológico entre 1 y 3 días de reperfusion. La comparación estadística en a) y d) fue realizada por ANOVA de una vía. NS, no significativo; * $p<0,05$, ** $p<0,01$. Tomado de Sanchez Mendoza et al. (2010).

En el caudado-putamen observamos una correlación negativa significativa en el caso de VGLUT2 y 3 y EAAT1 (Figura 11c-e), mientras que no observamos una correlación entre la expresión de EAAT3 y el deterioro neurológico (Figura 11f). Por el contrario, encontramos una correlación positiva para la expresión de VGLUT1 y EAAT2 (Figura 11a y g). Como en el caso de la corteza, encontramos una correlación positiva de VGLUT1 con el daño neurológico entre 1 y 3 días de reperfusion ($r=0,85$ $P<0,001$), mientras que ésta fue negativa a 7 días de reperfusion ($r=-0,085$; $P<0,001$; Figura 11a). En el caso de EAAT2, se encontró una correlación positiva a 24h de reperfusion ($r=0,97$; $P<0,001$), mientras que ésta fue negativa entre 3 y 7 días de reperfusion ($r=0,096$; $P<0,001$) (Figura 11g). Al ver la semejanza en la expresión de VGLUT1 y EAAT2 en esta estructura, realizamos un estudio de correlación entre la expresión de VGLUT1 y EAAT2 obteniendo una correlación positiva en todos los tiempos de reperfusion estudiados (0,558 ; $P<0,001$) (Figura 11h) .

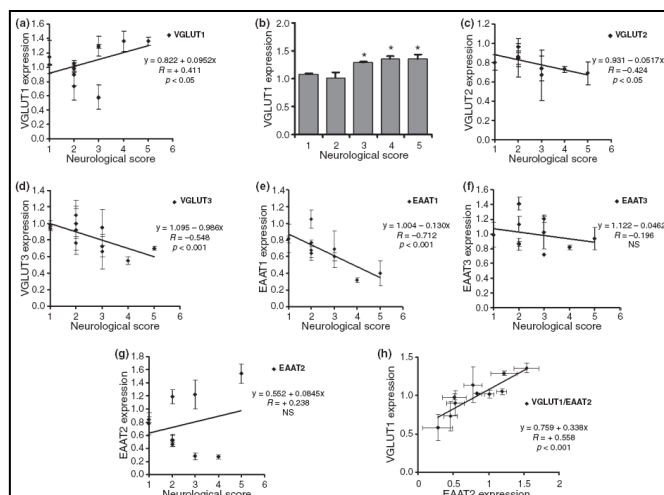


Figura 11: Correlación de los cambios en expresión de VGLUTs y EAATs con el deterioro neurológico en el caudado-putamen de ratas isquémicas. (a, c-h) regresión lineal de la correlación entre el daño neurológico de las ratas isquémicas y la expresión de VGLUT1 (a), VGLUT2 (c), VGLUT3 (d), EAAT1 (e), EAAT2 (g), EAAT3 (f) medida por western blot. Se indica la ecuación de la recta, el coeficiente de correlación (r) y significación estadística. b) Expresión de VGLUT1 a diferentes valores de daño neurológico entre 1 y 3 días de reperfusión ($p < 0.001$, ANOVA). h) Análisis de correlación lineal entre la expresión de EAAT2 y VGLUT1. La comparación estadística en a) y d) fue realizada por ANOVA de una vía. NS, no significativo; * $p < 0.05$. Tomado de Sanchez Mendoza et al. (2010).

1.3 Estudio de la expresión de VGLUTs y EAATs a nivel de ARNm, mediante RT-qPCR

Debido a las modificaciones observadas en la expresión de los transportadores de glutamato a nivel de proteína, en la corteza y en el caudado putamen, formulamos la hipótesis de que la acumulación de proteína se podría deber a un incremento en la síntesis de los mismos. Debido a la existencia de un desfase temporal entre la síntesis de ARNm y su traducción a proteína, añadimos en este estudio un nuevo subgrupo de animales con 6 horas de reperfusión que nos permitiera rastrear los cambios en la síntesis de ARNm en las etapas más tempranas de la reperfusión.

1.3.1 Alteraciones en la expresión de ARNm de VGLUTs

En general, los datos obtenidos muestran una tendencia de la expresión de los transportadores a reducirse, sin embargo la gran variabilidad de estos datos dificultó notablemente el análisis e interpretación de los mismos. Así, la mediana de todas las medidas fue siempre menor en el hemisferio isquémico que el control, pero esta diferencia no fue siempre significativa.

En la corteza, la expresión de VGLUT1 a nivel de ARNm se redujo significativamente a 6h y a 3 y 7 días de reperfusión, mientras que la expresión de VGLUT2 se redujo a 6h, 1 y 3 días de reperfusión. VGLUT3 se redujo significativamente a 1 y 3 días de reperfusión (Figura 12 A-C; Tabla 3). En el caudado putamen VGLUT1 mostró un descenso significativo a partir de 6h de reperfusión hasta el final del curso temporal. Igualmente VGLUT3 se redujo significativamente desde 1 día de reperfusión en adelante. VGLUT2 mostró una reducción significativa a 6h de reperfusión. En los demás puntos evaluados la mediana siempre fue menor que el

control pero dicha diferencia sólo fue significativa a 1 y 7 días de reperusión (Figura 12 D-F; Tabla 3).

Estos resultados indican que la isquemia podría inducir la reducción en la expresión de VGLUTs a nivel de ARNm. Sin embargo la dispersión de los datos sugiere que el grupo estudiado es pequeño ($n=5$) y que debe ampliarse para obtener un resultado verdaderamente preciso.

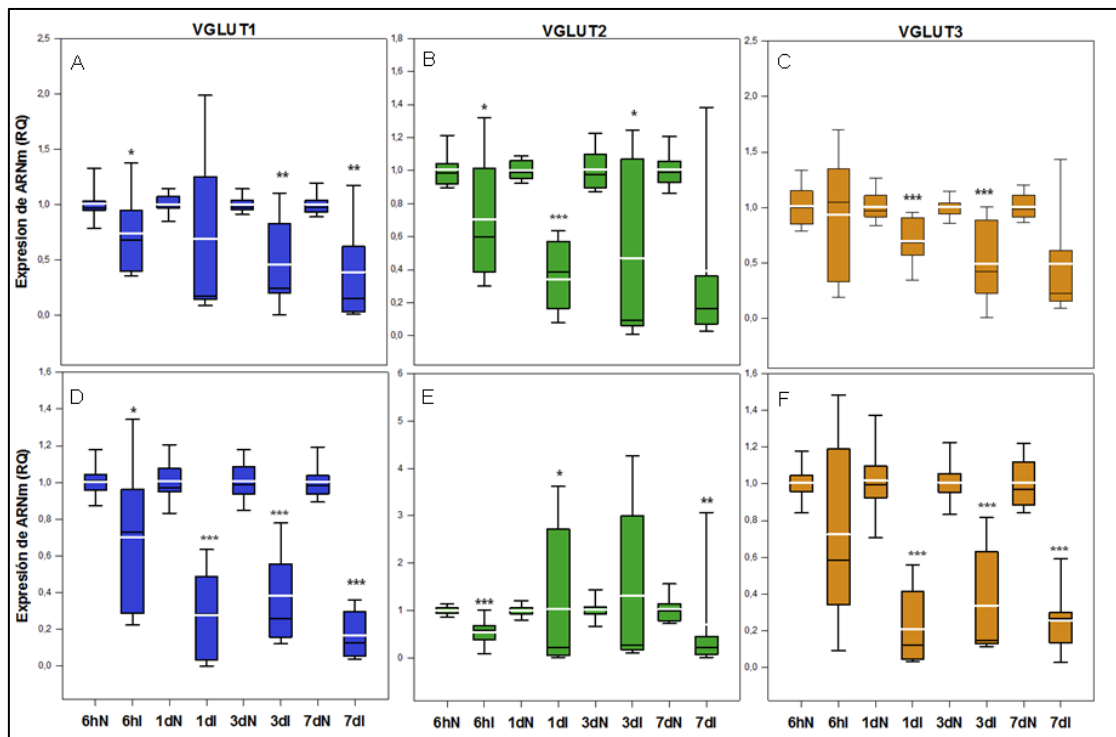


Figura 12: Alteraciones de la expresión de ARNm de VGLUT1, 2 y 3 en corteza (A-C) y caudado-putamen (D-F). Las ratas fueron sometidas a isquemia por el método del filamento intraluminal y reperusión durante 6 horas y 1, 3 y 7 días. Se analizó la expresión relativa de ARNm (RQ) de los genes por RT-qPCR comparando el valor del hemisferio isquémico (I) en relación a su hemisferio control (N) mediante la prueba de Mann-Whitney. Cada muestra fue analizada por triplicado. $n=5$ animales por grupo. Los datos están representados como diagramas de cajas y bigotes donde la raya horizontal negra indica la mediana y la raya blanca indica la media. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Tabla 3. Resumen de los valores de expresión de ARNm de VGLUTs obtenidos en el hemisferio control y el hemisferio isquémico.

	Gen	Hemisferios	6horas	1d	3d	7d
C x	VGLUT1	Control	0,97 ± 0,78; 1,36	0,99 ± 0,78; 1,17	0,98 ± 0,88; 1,19	0,98 ± 0,88; 1,22
		Isquemia	0,68 ± 0,31; 1,42 *	0,17 ± 0,09; 2,16	0,25 ± 0,003; 1,15 **	0,15 ± 0,01; 1,17 **
	VGLUT2	Control	0,99 ± 0,88; 1,24	0,99 ± 0,91; 1,11	0,98 ± 0,87; 1,23	0,99 ± 0,80; 1,25
		Isquemia	0,59 ± 0,23; 1,48 *	0,34 ± 0,07; 0,67 ***	0,94 ± 0,006; 1,25 *	0,17 ± 0,03; 1,54
	VGLUT3	Control	1,00 ± 0,75; 1,35	0,97 ± 0,81; 1,39	1,01 ± 0,78; 1,23	0,99 ± 0,86; 1,20
		Isquemia	1,04 ± 0,19; 1,97	0,68 ± 0,33; 0,96 ***	0,42 ± 0,005; 1,12 ***	0,22 ± 0,09; 1,66
Cpu	VGLUT1	Control	1,007 ± 0,81; 1,18	0,971 ± 0,79; 1,23	0,99 ± 0,81; 1,27	0,98 ± 0,85; 1,27
		Isquemia	0,73 ± 0,22; 1,35 *	0,28 ± 0,001; 0,67 ***	0,26 ± 0,12; 0,78 ***	0,13 ± 0,04; 0,37 ***
	VGLUT2	Control	1,001 ± 0,75; 1,25	1,02 ± 0,79; 1,21	1,02 ± 0,63; 1,51	0,99 ± 0,69; 1,65
		Isquemia	0,59 ± 0,08; 1,11 ***	0,217 ± 0,01; 3,62 *	0,26 ± 0,09; 5,03	0,22 ± 0,004; 4,29 **
	VGLUT3	Control	1,002 ± 0,78; 1,21	0,99 ± 0,65; 1,40	1,002 ± 0,74; 1,28	0,97 ± 0,82; 1,22
		Isquemia	0,58 ± 0,08; 1,49	0,12 ± 0,03; 0,59 ***	0,15 ± 0,12; 0,84 ***	0,27 ± 0,02; 0,67 ***

Los datos fueron obtenidos mediante la ecuación descrita en materiales y métodos, que genera un valor de expresión relativa (RQ). Se indica el valor de la mediana y valores mínimo y máximo de los datos obtenidos de acuerdo con Zachrisson et al. (2011). Cada grupo tuvo 5 animales (n=5). Cada punto experimental fue analizado por triplicado y fue comparado con su control respectivo por la prueba t-Student. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

1.3.2 Alteraciones en la expresión de ARNm de EAATs

Como en el caso de los VGLUTs, el ARNm de los EAATs mostró una reducción característica, pero nuevamente la dispersión de los datos impide llegar a una conclusión irrevocable.

En la corteza EAAT1 se redujo significativamente a 1 y 3 días de reperusión, mientras que EAAT2 sólo alcanzó una diferencia significativa a 3 y 7 días de reperusión. Por el contrario, EAAT3 se reduce significativamente desde 1 día de reperusión hasta el final de curso temporal (Figura 13 A-C, Tabla 4). En el caudado putamen EAAT1 y 2 se reducen significativamente desde 1 día de reperusión en adelante, mientras que EAAT3 lo hace a partir de las 6h (Figura 13 D-E, Tabla 4).

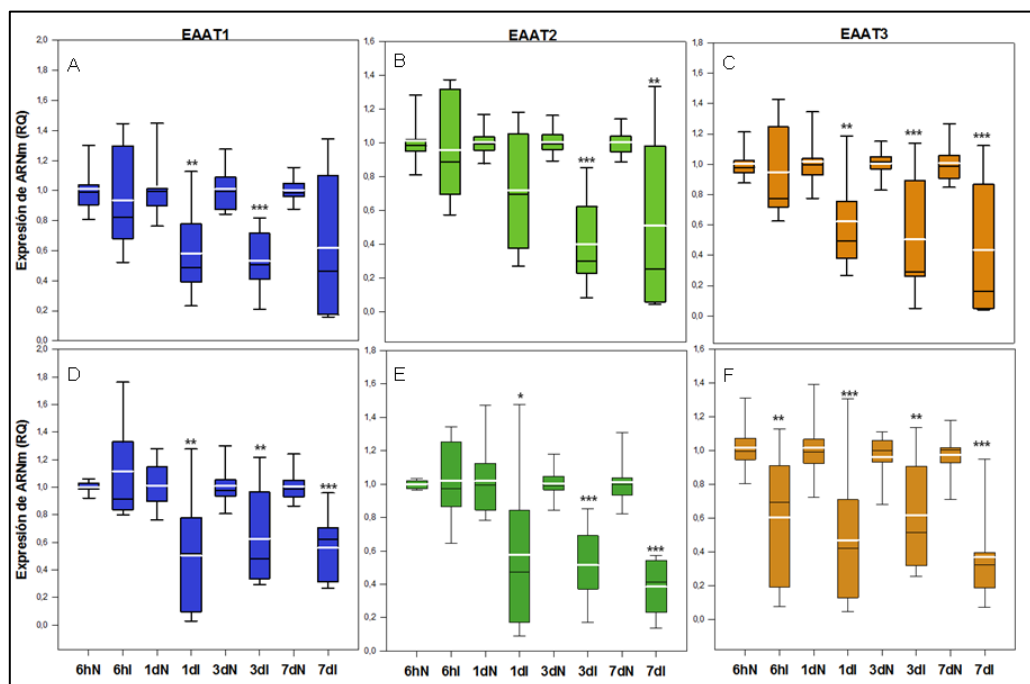


Figura 13: Alteraciones de la expresión de ARNm de EAAT1, 2 y 3 en corteza cerebral (A-C) y caudado-putamen (D-F). Las ratas fueron sometidas a isquemia por el método del filamento intraluminal y reperusión durante 6 horas y 1, 3 y 7 días. Se analizó la expresión relativa de ARNm (RQ) de los genes por RT-qPCR comparando el valor del hemisferio isquémico (I) en relación a su hemisferio control (N) mediante la prueba de Mann-Whitney. Cada muestra fue analizada por triplicado. n=5 animales por grupo. Los datos están representados como diagramas de cajas y bigotes donde la raya horizontal negra indica la mediana y la raya blanca indica la media. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

En conjunto estos datos indican que la tMCAO podría inducir una reducción en la expresión de los ARNm de VGLUTs y EAATs en corteza y caudado-putamen. Es importante tener en cuenta que la reducción de expresión que estamos observando podría deberse a la muerte del tejido o a mecanismos de represión de la expresión génica, lo cual deberá ser evaluado en el futuro. También hay que destacar que la amplia dispersión de datos hace difícil llegar a una conclusión definitiva sobre esta observación. Los valores de las medianas en el hemisferio isquémico claramente sugieren una reducción muy significativa de la expresión de los transportadores, sin embargo la dispersión de datos nos impide determinar estas diferencias como significativas en algunos casos donde parece haber una diferencia evidente (ej. VGLUT1 a 1 día de reperusión en la corteza). Por lo tanto será imprescindible ampliar el grupo de animales estudiados.

Tabla 4. Resumen de los valores de expresión de ARNm de EAATs obtenidos en el hemisferio control y el hemisferio isquémico.

	Gen	Hemisferios	6h	1d	3d	7d
Cx	EAAT1	Control	0,99 ± 0,79; 1,35	0,99 ± 0,62; 1,79	0,99 ± 0,82; 1,42	0,98 ± 0,85; 1,21
		Isquemia	0,82 ± 0,43; 1,52	0,49 ± 0,22; 1,13 **	0,51 ± 0,20; 0,83 ***	0,46 ± 0,16; 1,37
	EAAT2	Control	0,98 ± 0,81; 1,53	0,99 ± 0,84; 1,17	0,99 ± 0,85; 1,21	1,001 ± 0,87; 1,25
		Isquemia	0,88 ± 0,57; 1,38	0,69 ± 0,26; 1,37	0,30 ± 0,08; 0,96 ***	0,25 ± 0,04; 1,40 **
	EAAT3	Control	0,98 ± 0,87; 1,22	0,99 ± 0,74; 1,69	1,02 ± 0,80; 1,17	0,99 ± 0,78; 1,27
		Isquemia	0,77 ± 0,55; 1,46	0,49 ± 0,25; 1,19 **	0,29 ± 0,05; 1,15 ***	0,16 ± 0,04; 1,22 ***
CPu	EAAT1	Control	1,003 ± 0,88; 1,09	1,007 ± 0,75; 1,31	0,97 ± 0,77; 1,37	0,99 ± 0,85; 1,28
		Isquemia	0,91 ± 0,77; 1,77	0,517 ± 0,03; 1,397 **	0,480 ± 0,29; 1,28 **	0,62 ± 0,25; 1,09 ***
	EAAT2	Control	1,001 ± 0,96; 1,04	0,99 ± 0,78; 1,60	0,99 ± 0,78; 1,24	0,99 ± 0,78; 1,49
		Isquemia	0,97 ± 0,63; 1,35	0,47 ± 0,08; 1,66 *	0,51 ± 0,17; 0,87 ***	0,41 ± 0,13; 0,57 ***
	EAAT3	Control	0,99 ± 0,65; 1,47	0,99 ± 0,65; 1,47	0,99 ± 0,39; 1,12	1,006 ± 0,60; 1,28
		Isquemia	0,69 ± 0,07; 1,32 **	0,42 ± 0,05; 1,52 ***	0,51 ± 0,18; 1,17 **	0,322 ± 0,07; 1,00 ***

Los datos fueron obtenidos mediante la ecuación descrita en materiales y métodos, que genera un valor de expresión relativa (RQ). Se indica el valor de la mediana y valores mínimo y máximo de los datos obtenidos de acuerdo con Zachrisson et al. (2011). Cada grupo tuvo 5 animales (n=5). Cada punto experimental fue analizado por triplicado y fue comparado con su control respectivo por la prueba t-Student. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

1.3.3 Correlaciones entre las alteraciones en la expresión de ARNm de transportadores de glutamato y el deterioro neurológico

A diferencia de la valoración de proteínas, en este caso no hemos encontrado correlaciones positivas significativas entre la expresión de los VGLUTs o EAATs en las estructuras estudiadas y el daño neurológico al analizar todos los valores de RQ de todos los puntos del curso temporal (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los valores de correlación de Pearson entre el RQ de cada transportador y el daño neurológico.

Estructura	Corteza			Caudado Putamen		
Transportador	VGLUT1	VGLUT2	VGLUT3	VGLUT1	VGLUT2	VGLUT3
C. Pearson	-0,25	0,13	0,29	-0,27	-0,02	0,02
P	0,28	0,58	0,20	0,012	0,26	0,93
n	20	20	20	20	20	20
Transportador	EAAT1	EAAT2	EAAT3	EAAT1	EAAT2	EAAT3
C. Pearson	-0,015	-0,035	0,13	0,2	0,13	0,11
P	0,95	0,88	0,58	0,92	0,41	0,58
n	20	20	20	20	20	20

Se han considerado los valores de RQ de cada transportador en el hemisferio isquémico de todas las ratas en conjunto (n=20). No se ha encontrado ninguna correlación *positiva* estadísticamente significativa.

Realizamos un análisis más detallado de la correlación entre el daño neurológico y la expresión de los diferentes transportadores estudiando las variaciones día por día. Este procedimiento reveló que mayormente la expresión de ARNm de los

VGLUTs o EAATs es independiente del daño neurológico (Tablas 6 y 7). Excepcionalmente VGLUT2 y 3 y EAAT1 se asociaron negativamente de manera significativa al daño neurológico en el caudado putamen, indicando que la severidad del daño podría afectar a la expresión de los transportadores. En vista de esto la explicación más probable tendría que ser que las células que expresan estos transportadores en esta estructura estarían muriendo (Tabla 6)

Tabla 6. Resumen detallado de las correlaciones de Pearson entre la expresión de ARNm de los VGLUTs y el daño neurológico por días y por estructura estudiada.

Estructura	Corteza				Caudado Putamen			
VGLUT1	6h	1d	3d	7d	6h	1d	3d	7d
C. Pearson	-0,74	-0,77	-0,31	0,11	0,50	0,94	0,40	-0,12
P	0,15	0,13	0,62	0,86	0,38	0,058	0,5	0,84
N	5	5	5	5	5	5	5	5
VGLUT2	6h	1d	3d	7d	6h	1d	3d	7d
C. Pearson	-0,23	0,18	-0,04	0,35	-0,03	-0,061	-0,93	0,58
P	0,71	0,77	0,95	0,57	0,96	0,94	0,02	0,30
N	5	5	5	5	5	5	5	5
VGLUT3	6h	1d	3d	7d	6h	1d	3d	7d
C. Pearson	0,782	-0,57	-0,21	0,34	-0,43	0,20	-0,94	0,85
P	0,12	0,32	0,74	0,58	0,47	0,79	0,02	0,06
N	5	5	5	5	5	5	5	5

Tabla 7. Resumen detallado de las correlaciones de Pearson entre la expresión de ARNm de los EAATs y el daño neurológico por días y por estructura estudiada.

Estructura	Corteza				Caudado Putamen			
EAAT1	6h	1d	3d	7d	6h	1d	3d	7d
C. Pearson	-0,61	-0,11	-0,04	-0,19	-0,51	0,12	-0,88	0,74
P	0,28	0,86	0,95	0,76	0,38	0,88	0,05	0,15
N	5	5	5	5	5	5	5	5
EAAT2	6h	1d	3d	7d	6h	1d	3d	7d
C. Pearson	-0,21	-0,52	-0,17	-0,48	-0,23	-0,12	-0,64	0,96
P	0,73	0,37	0,79	0,41	0,71	0,88	0,25	0,10
N	5	5	5	5	5	5	5	5
EAAT3	6h	1d	3d	7d	6h	1d	3d	7d
C. Pearson	-0,54	0,13	-0,08	-0,20	0,56	0,10	-0,85	0,77
P	0,35	0,83	0,89	0,74	0,32	0,89	0,07	0,13
N	5	5	5	5	5	5	5	5

1.3.4 Inmunodetección de VGLUT1 en la corteza isquémica mediante microscopía electrónica.

El resultado de RT-qPCR sugiere que el incremento en los niveles de VGLUT1 a nivel de proteína en corteza y caudado putamen podrían no deberse principalmente a un incremento en la síntesis de ARNm, ya que no se observa un claro incremento en la expresión del ARNm. Por ello, decidimos evaluar por microscopía electrónica la expresión de este transportador en la corteza isquémica. Mediante esta técnica pudimos observar la presencia del transportador en vesículas presentes en preterminales axónicas en el hemisferio contralateral (Figura 14 A-C), y botones sinápticos en el hemisferio ipsilateral, así como en el aparato de Golgi del hemisferio isquémico (Figura 14 D-F). Esto indica que a pesar de haber observado una reducción relativa en el nivel de ARNm de VGLUT1, la síntesis de la proteína no se ha detenido completamente a consecuencia de la isquemia y probablemente sea funcional al estar presente en vesículas sinápticas.

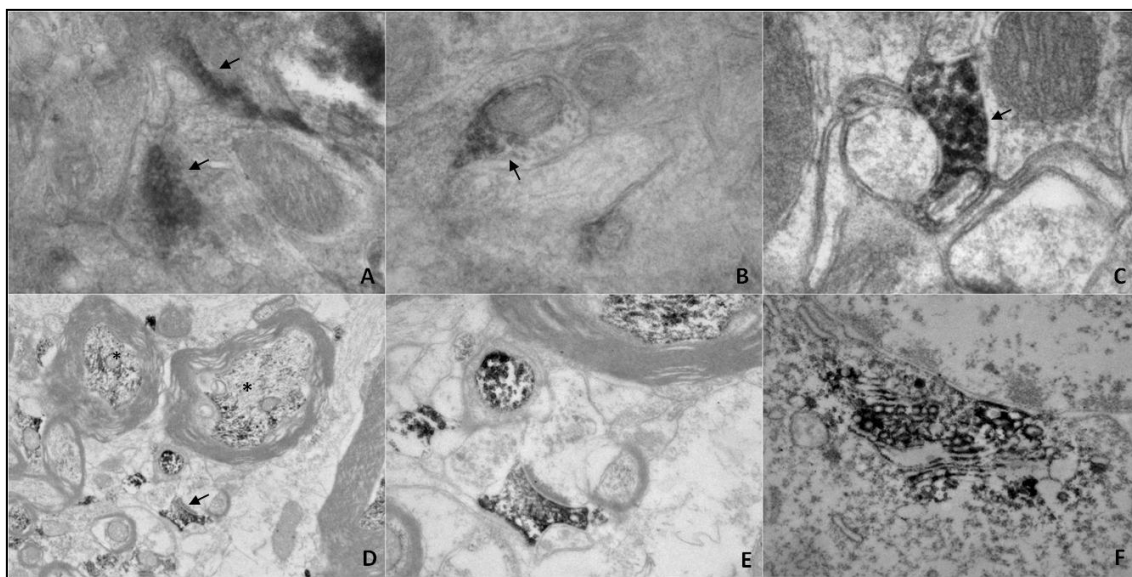


Figura 14: Microscopía electrónica de VGLUT1 en el hemisferio normal (A-C) e isquémico (D-F). Observamos vesículas marcadas con el transportador en preterminales axónicas (A-C) (flechas). D) Aspecto amplio de una sección donde se observan axones mielinizados con vesículas marcadas (*) y una sinapsis asimétrica (flecha). E) Detalle de la sinapsis presente en D. F) Detección de VGLUT1 en el aparato de Golgi. Esto sugiere un proceso activo de síntesis de VGLUT1 en la zona lesionada. Aumentos. A,F) 80000X, B) 100000X, C) 120000X, D) 20000X, E) 50000X.

1.4 Caracterización de la expresión de VGLUTs en la glía reactiva

1.4.1 Los VGLUTs se expresan en la glía reactiva en el cuerpo calloso isquémico. Colocalización de VGLUTS y GFAP

La observación detallada con mayores aumentos de la inmunohistoquímica de los VGLUTs, reveló la aparición de células de aspecto estrellado en el cuerpo calloso

del hemisferio isquémico (CCi) con VGLUT2 y VGLUT3 (Figura 15 D,F), mientras que dichas células no se apreciaron en el hemisferio contralateral (Figura 15C,E). Atendiendo a las características morfológicas de estas células y a su ubicación, formulamos la hipótesis de que podría tratarse de células gliales reactivas (Figura 15). Ya que la proliferación de células gliales reactivas en el CCI y en las proximidades de la corteza isquémica había sido anteriormente demostrada por (Li et al., 2008), realizamos una inmunohistoquímica con anti-GFAP y detectamos la presencia de glía reactiva en estas zonas en nuestro modelo de isquemia (Figura 15 A-B).

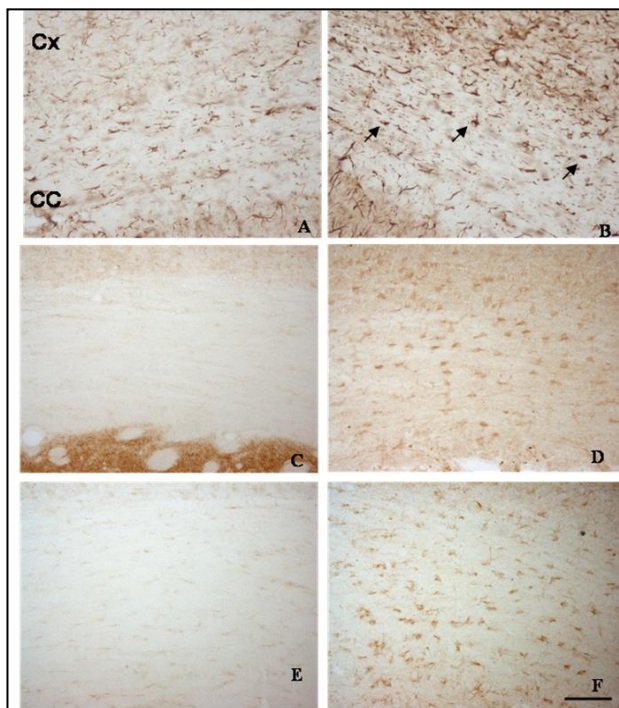


Figura 15: La isquemia promueve la activación de la glía y la aparición de VGLUT2 y 3 en células del cuerpo calloso isquémico. A y B: Detección de GFAP en el cuerpo calloso normal e isquémico respectivamente. Las células más intensamente marcadas en B revelan reactividad glial (flechas). C, D: Inmunodetección de VGLUT2 en células del cuerpo calloso normal e isquémico respectivamente. E, F: Inmunodetección de VGLUT3 en células del cuerpo calloso normal e isquémico respectivamente. Barra de escala: 10 μ m.

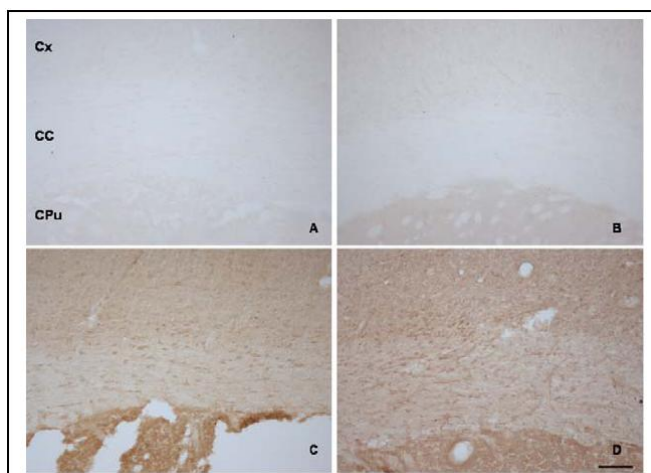


Figura 16: Los anticuerpos secundarios para anti-rabbit no generan señal inespecífica en el CCI. El control negativo se realizó eliminando los anticuerpos primarios de VGLUTs pero añadiendo el anticuerpo secundario. No se genera precipitado de DAB en el hemisferio isquémico en ausencia del anticuerpo anti-VGLUT2 (A) ni el anti-VGLUT3 (B). C-D) VGLUT2 y 3 respectivamente en el hemisferio isquémico. Barra de escala: 20 μ m.

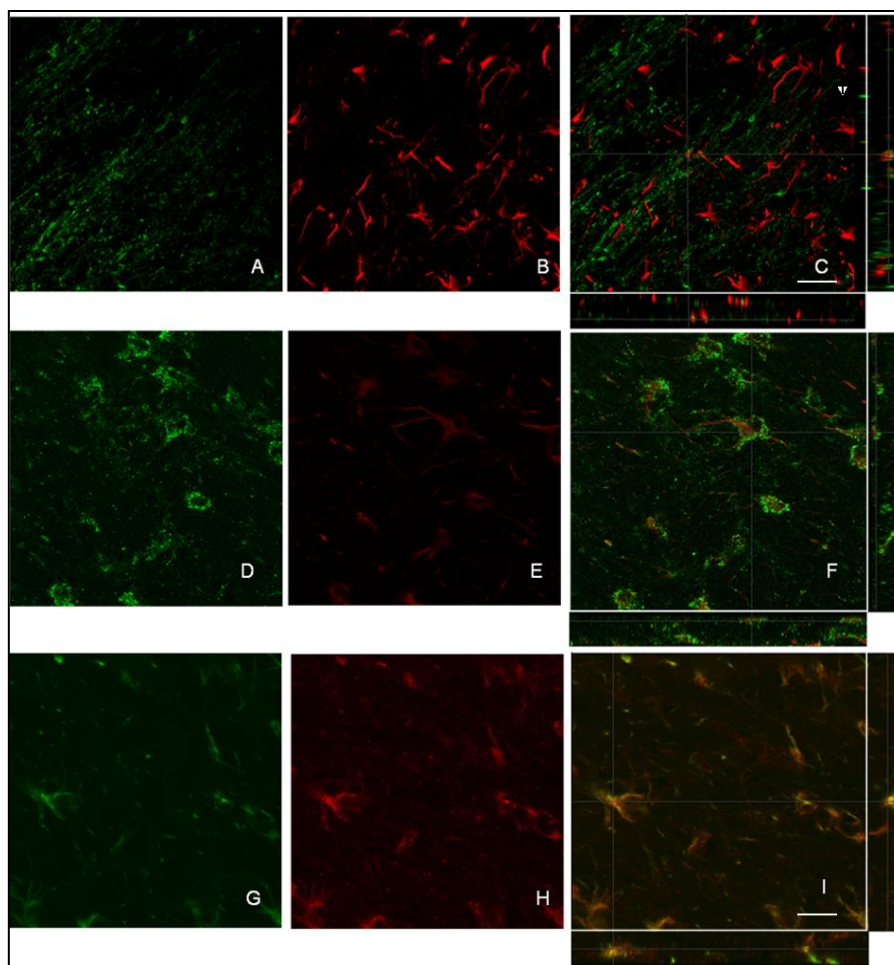


Figura 17: Colocalización de VGLUT2 y 3 con glía reactiva en el cuerpo calloso isquémico. Análisis de microscopía confocal del marcaje de VGLUTs con GFAP mostrando: **A-C** la no colocalización de VGLUT1 (A; verde) con GFAP (B; rojo). **D-E** La colocalización de VGLUT2 (D; verde) con la glía reactiva (E; rojo), de acuerdo con la mezcla de ambas señales (F). **G-I**: La colocalización de VGLUT3 (G; verde) con las células también marcadas con GFAP (H; rojo) según se desprende de la mezcla de ambas señales (C). En C, F e I también se muestran el stack de las proyecciones de los ejes XZ e YZ. Barra de escala: **A-C**: 20 μm . **D-I**: 10 μm .

Posteriormente, realizamos dobles inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos secundarios marcados con diferentes fluorocromos para determinar si existía colocalización de los diferentes VGLUTs con el marcador GFAP, mediante microscopía confocal. Dichos experimentos revelaron que en el CCI existe colocalización de VGLUT2 y 3 con la glía reactiva (Figura 17D-I), mientras que esta colocalización no se da en el caso de VGLUT1 (Figura 17A-C).

1.4.2 Colocalización de VGLUTs y Glutamina Sintetasa

Para confirmar la expresión de VGLUT2 y 3 por la glía reactiva se realizó una doble inmunodetección de los VGLUTs con la enzima glutamina sintetasa (GS), la cual marca todo el volumen del astrocito (Bushong et al., 2002). El experimento reveló que VGLUT2 y 3 pueden encontrarse en células que expresen esta enzima (Figura 18), lo que confirma la expresión de los mismos por la glía reactiva. Sin embargo, también

detectamos células que expresaban exclusivamente VGLUT2 o 3 o GS (Figuras 18c y f), lo que sugiere una localización espacial diferente o una segregación celular para la GS y VGLUT dependiendo del plano observado. Esto se confirmó mediante las proyecciones XYZ (Figura 18c y f).

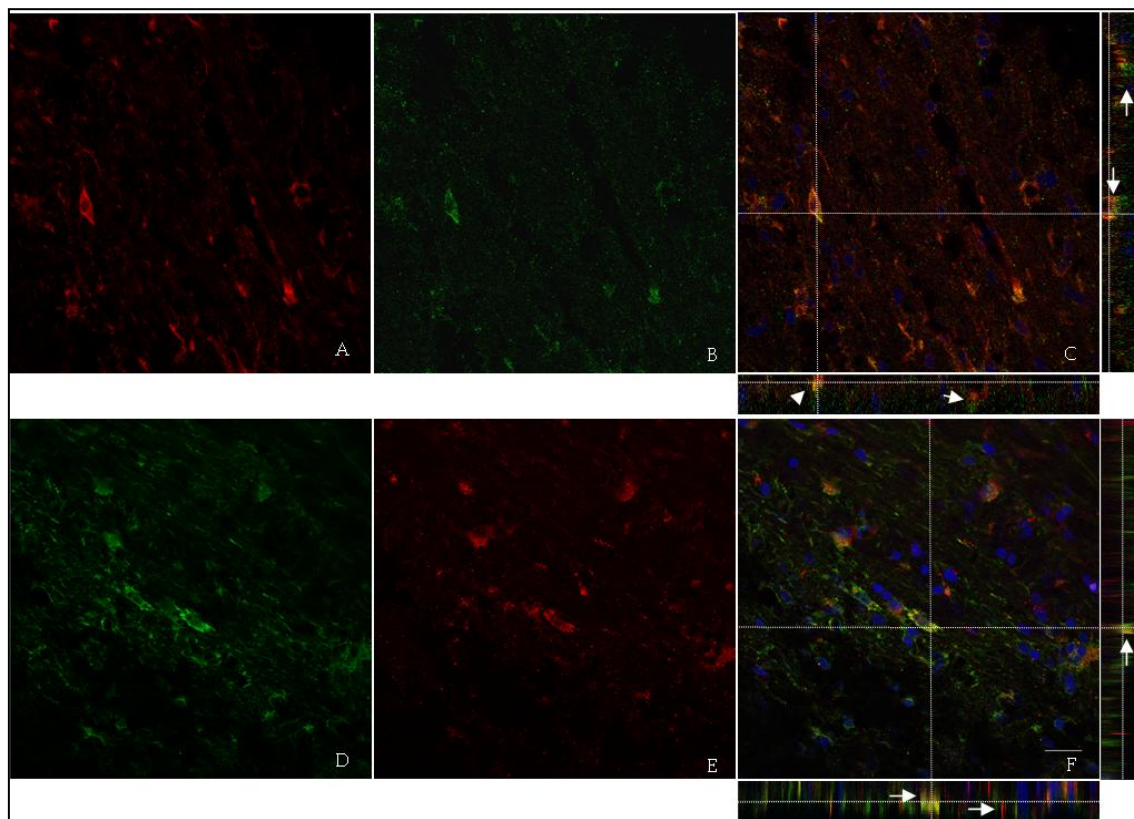


Figure 18: Coexpresión de glutamina sintetasa (GS) y VGLUTS en diferentes células del cuerpo calloso isquémico. (A,D) Glutamina sintetasa (B) VGLUT2 (E) VGLUT3 (C, F) Superposición. Las imágenes superpuestas muestran las proyecciones XZ e YZ de la coexpresión de VGLUT2/GS y VGLUT3/GS, respectivamente. Las flechas indican que ambas proteínas pueden colocalizar o no dependiendo del plano enfocado como indican las señales rojas, verdes y amarillas observadas (flechas). Barra de escala: 40 μ m.

Durante la perfusión el CCI es una vía de paso para las CPNs provenientes de la SVZ (ver introducción). Como ya se ha mencionado, diversas investigaciones han ido desvelando la importancia de los neurotransmisores como parte del mecanismo de señalización implicado en proliferación, supervivencia, migración y diferenciación de las CPNs (Platel et al., 2007; Platel et al., 2008a; Platel et al., 2010a). Por lo tanto, los resultados obtenidos sobre la expresión de VGLUT2 y 3 en la glía reactiva nos llevaron a plantear la posibilidad de que las células gliales modulasen la migración de las CPNs a través de la liberación de glutamato o de que ellas mismas sean derivadas de la SVZ. Para probar esta hipótesis recurrimos a un modelo de cultivo de neuroesferas derivadas de la SVZ que nos ha permitido evaluar la presencia de los VGLUTs en estas células y estudiar su modulación en un modelo de exposición a medios condicionados por neuronas, astrocitos sometidas a isquemia *in vitro* (POG).

2. Implicación de las alteraciones de la expresión de VGLUTs y EAATs en el proceso de neurogénesis de la SVZ

2.1 Caracterización de la expresión de VGLUTs y EAATs en las células precursoras neurales de la SVZ

2.1.1 Morfología del cultivo de CPNs

Los cultivos de CPNs crecieron durante 7-10 días en flotación y fueron sembrados posteriormente en placas previamente tratadas con polilisina en un medio sin factores de crecimiento. La adhesión de las células a las placas y la ausencia de factores de crecimiento inducen la salida del ciclo celular y la entrada en diferenciación. Las células comienzan a migrar alejándose del centro de la esfera a medida que adquieren su fenotipo final. Durante este período las células fueron expuestas a diferentes tipos de estímulos y evaluamos el efecto de los mismos sobre la diferenciación celular y la expresión de los VGLUTs y EAATs (Figura 19).

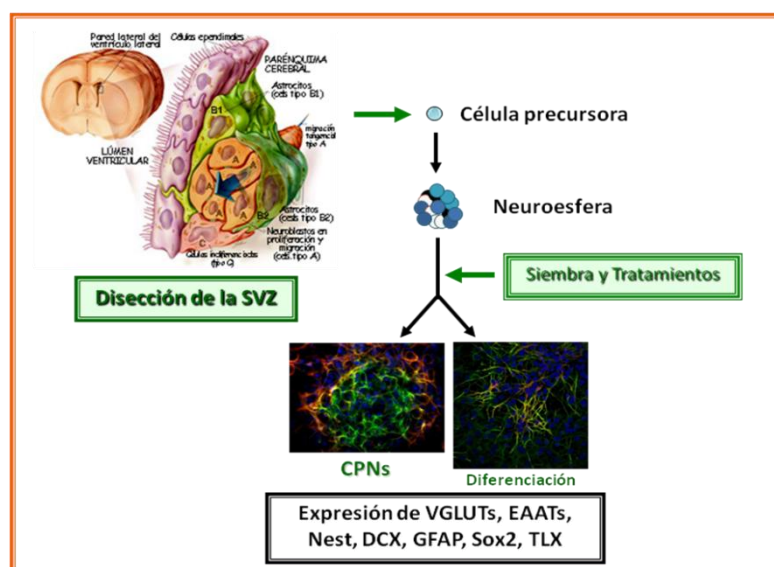


Figura 19: Esquema resumen de la aproximación experimental con CPNs. La SVZ es diseccionada y disgregada completamente. Se forman neuroesferas a partir de la proliferación de células precursoras en flotación. Después de 7-10 días de cultivo las neuroesferas se siembran en placas con polilisina y se les aplican los tratamientos. Un tratamiento proneurogénico favorecerá la diferenciación mientras que un tratamiento anti neurogénico retrasará la diferenciación.

Los cultivos se examinaron a diferentes tiempos de diferenciación. De manera general pudimos observar dos zonas diferenciables, una central (A) y otra periférica (B) (Figura 20). La zona A corresponde a células indiferenciadas que se mantienen aproximadamente hasta los 3 días de diferenciación. La zona B rodea a la zona central y contiene astrocitos y neuroblastos identificables por la expresión de proteínas como GFAP o DCX respectivamente.

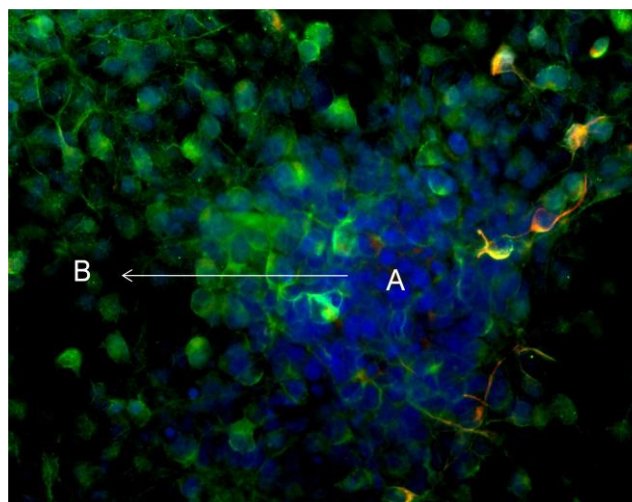


Figura 20: Características de la organización de las células progenitoras *in vitro*. Tras la siembra de las esferas las células migran desde la zona A (centro de la esfera) hacia la zona B (exterior) en donde adquieren su fenotipo final: neuroblastos y neuronas o células gliales. En esta imagen observamos marcaje para VGLUT2 (verde) y Nestina (rojo).

2.1.2 Curso temporal de la expresión de VGLUTs y EAATs a nivel de ARNm en células precursoras neurales.

La expresión de los diferentes transportadores fue analizada a lo largo de 15 días de diferenciación mediante RT-qPCR y hasta un máximo de 10 días por western blot.

El análisis de RT-qPCR se realizó comparando la expresión de los VGLUTs, EAATs y variables de neurogénesis contra los valores obtenidos en esferas que se mantuvieron un máximo de 10 días en flotación antes de la siembra. La expresión, a nivel de ARNm, de ambos tipos de transportadores VGLUTs y EAATs, mostró una clara curva ascendente a lo largo del tiempo de cultivo (Figura 21A-B), que, como se analizará en el apartado 2.2.3, fue paralela al incremento en la expresión de los marcadores de diferenciación celular.

La expresión de Vglut1 alcanza un incremento significativo entre los 10 y 15 días de diferenciación, mientras que la de Vglut2 se incrementa notablemente desde el comienzo del período de diferenciación; sin embargo la expresión de este gen resulta difícil de medir con precisión en las fases iniciales de diferenciación. Detectamos un incremento significativo de ARNm nuevamente a partir de los 10 días de diferenciación que sigue aumentando a los 15 días. Vglut3 alcanza un pico de expresión a los 5 días de diferenciación que se mantiene estable hasta el final del experimento (Figura 21 A, Tabla 8). Es de hacer notar que los tres transportadores siguen curvas de crecimiento diferentes, lo que sugiere diferentes mecanismos de regulación.

El ARNm de los transportadores de membrana presenta variaciones muy diferentes. La expresión de EAAT1 presenta un ligero incremento significativo exclusivamente a 10 días de diferenciación. Por el contrario, la de EAAT2, se incrementa significativamente desde los 5 días de diferenciación, alcanza el pico de

mayor expresión a los 10 días y posteriormente disminuye. La expresión de EAAT3 alcanza su valor máximo a los 5 días de diferenciación y se reduce gradualmente desde los 10 días hasta equipararse con el control a los 15 días de diferenciación. Es importante señalar que el transportador que alcanza un mayor nivel de expresión relativo a su control es EAAT2, lo que sugiere que este transportador podría tener un papel más importante en la regulación de los niveles de glutamato en el cultivo (Figura 21 B, Tabla 8).

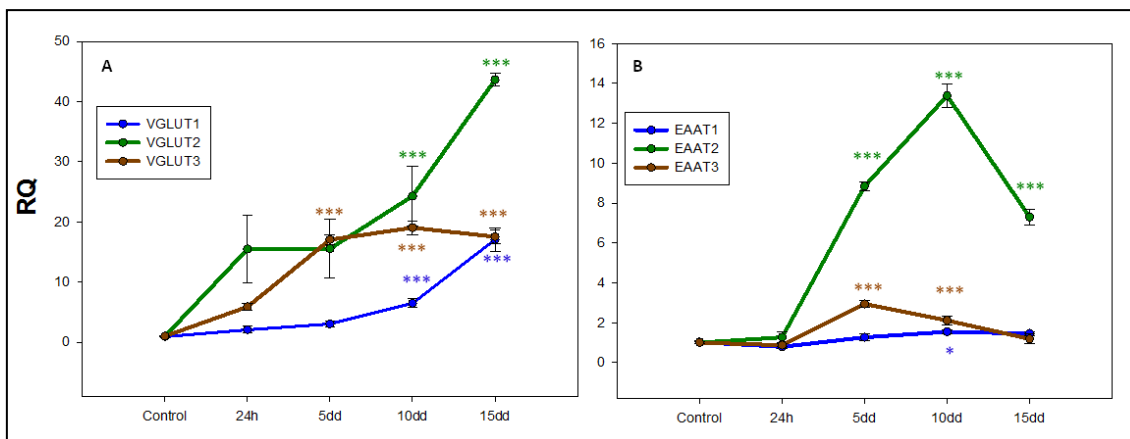


Figura 21: Expresión de ARNm de VGLUTs y EAATs en las CPNs. A) VGLUT1, 2 y 3 muestran una tendencia a aumentar a lo largo de 15 días de diferenciación. B) EAAT1 no se altera respecto al control, indicando que este transportador no es el principal en las CPNs, mientras que EAAT2 es el que muestra mayor nivel de síntesis a lo largo del curso temporal. EAAT3 presenta un pico a los 5 días, para después reducirse hasta el final del curso temporal. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados por ANOVA de una vía seguido de Tukey. $n=3$ experimentos analizados por triplicado. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

Tabla 8. Caracterización de la expresión de VGLUTs y EAATs en un período de 15 días de diferenciación.

Genes	Control	24h	5 d	10d	15d
VGLUT1	0,95 ± 0,11	2,08 ± 0,56	3,05 ± 0,42	6,48 ± 0,73 ***	17,07 ± 1,95 ***
VGLUT2	1,01 ± 0,08	15,49 ± 5,70	15,56 ± 4,88	24,30 ± 4,96 ***	43,62 ± 1,80 ***
VGLUT3	1,01 ± 0,14	5,89 ± 0,58	17,06 ± 0,78 ***	19,05 ± 1,16 ***	17,56 ± 1,17 ***
EAAT1	1,03 ± 0,10	0,79 ± 0,10	1,27 ± 0,16	1,55 ± 0,01 *	1,46 ± 0,09
EAAT2	1,01 ± 0,04	1,27 ± 0,26	8,85 ± 0,23 ***	13,38 ± 0,58 ***	7,30 ± 0,40 ***
EAAT3	1,01 ± 0,04	0,88 ± 0,07	2,95 ± 0,16 ***	2,11 ± 0,22 ***	1,19 ± 0,25

Los valores de expresión (RQ) fueron obtenidos por RT-qPCR y comparados con la expresión en células de 10 días en flotación, por lo que estaban completamente indiferenciadas. Los datos indican incrementos o descensos dependientes de la variable medida a partir de las primeras 24h de siembra, lo que sugiere una importante función de los transportadores en este período. Los datos fueron analizados por ANOVA de una vía seguido de Tukey. $n=3$ experimentos analizados por triplicado. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

2.1.3 Curso temporal de las variables de neurogénesis en CPNs.

Para estudiar el nivel de diferenciación del cultivo escogimos diferentes genes marcadores de los estados más característicos de diferenciación de las CPNs; nestina, como marcador de células precursoras, y DCX y GFAP como indicadores principales marcadores de formación de neuroblastos y células gliales, pero también B3T, proteína del citoesqueleto de neuronas, NCAM, dado que la proteína polisialilada PSA-NCAM es un marcador de migración, y TLX y SOX2 que son proteínas implicadas en la retención de las CPNs en estado proliferativo (Qu and Shi, 2009; Bath and Lee, 2010). De acuerdo con múltiples trabajos a medida que las CPNs se diferencian deberíamos observar un incremento en la expresión de DCX, GFAP, B3T y NCAM, mientras nestina, TLX y SOX2 deberían reducirse (Quinones-Hinojosa et al., 2006; Agasse et al., 2007; Bernardino et al., 2008).

Nestina no mostró diferencias en las primeras 24h de diferenciación, lo que sugiere un período de adaptación de las CPNs a la siembra. A partir de este punto observamos un descenso significativo a los 5 días de diferenciación se mantiene estable hasta el final del cultivo (Figura 22; Tabla 9). SOX2 y TLX aumentaron al doble del nivel control a partir de los 5 días de diferenciación, manteniéndose aproximadamente constantes hasta el final del cultivo (Figura 22^a, Tabla 9). Dado que estos dos genes no se reducen paralelamente con Nestina, es posible que exista una pequeña proporción de células que mantengan una cierta capacidad proliferativa a lo largo del período de diferenciación, posiblemente células tipo C. DCX aumenta significativamente a partir de los 5 días de diferenciación, manteniéndose constante hasta el final del cultivo (Figura 21B, Tabla 9). B3T sigue una curva muy similar a la de DCX, mostrando un incremento significativo a partir de los 5 días de diferenciación que se mantiene estable hasta el final del cultivo a pesar de mostrar una ligera variación (Figura 22B, Tabla 9). NCAM, por el contrario, alcanza un incremento significativo a los 5 días de diferenciación pero continúa incrementándose hasta alcanzar el máximo a los 10 días y luego se reduce hacia el final del cultivo (Figura 22B, Tabla 9). GFAP muestra un incremento mucho más notable que las demás variables desde los 5 días de diferenciación, pero este incremento alcanza significación a partir de los 10 días de diferenciación y continúa mostrando una tendencia al alza, en contraste con las demás variables, a los 15 días de diferenciación (Figura 22C, Tabla 9).

En conjunto estos datos indican que en nuestras condiciones de cultivo las CPNs se diferencian tanto a neuronas como a células gliales. El patrón de expresión de los VGLUTs y del transportador EAAT2 indica la existencia de un paralelismo entre la diferenciación de las células y la aparición de los diferentes transportadores. Sin embargo, esta correlación no es tan aparente respecto a los transportadores de membrana EAAT1 y 3, cuya expresión no se ve notablemente incrementada a lo largo del tiempo de diferenciación.

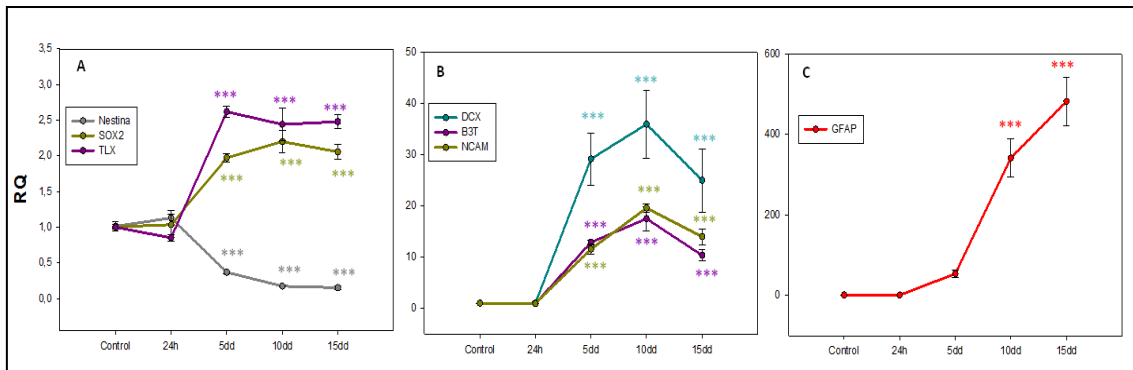


Figura 22: Expresión de ARNm de diferentes variables de diferenciación de las CPNs. Expresión de marcadores de diferenciación: A: Nestina se reduce a lo largo de los 15 días mientras que DCX, NCAM y B3T (B) aumentan significativamente respecto al control, indicando que se están generando neuroblastos y neuronas a lo largo del curso temporal. SOX2 y TLX (A) se elevan ligeramente sobre el control indicando que puede existir una población de células en mitosis. De acuerdo con C, también hay un incremento muy significativo de la expresión de GFAP, indicando que además de neuroblastos el cultivo de CPNs está generando células gliales. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados por ANOVA de una vía seguido de Tukey. n=3 experimentos analizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Tabla 9. Caracterización de la expresión de variables de neurogénesis en un período de 15 días de diferenciación.

Genes	Control	24h	5 d	10d	15d
Nestina	1,014 ± 0,06	1,13 ± 0,10	0,37 ± 0,02 ***	0,175 ± 0 ***	0,15 ± 0,02 ***
SOX2	1,00 ± 0,03	1,04 ± 0,14	1,97 ± 0,06 ***	2,20 ± 0,152 ***	2,06 ± 0,10 ***
TLX	1,02 ± 0,01	0,85 ± 0,05	2,62 ± 0,08 ***	2,44 ± 0,23 ***	2,48 ± 0,10 ***
DCX	1,05 ± 0,12	1,02 ± 0,24	29,17 ± 5,06 ***	35,96 ± 6,70 ***	25,01 ± 6,17 ***
NCAM	1,05 ± 0	0,97 ± 0,05	11,56 ± 1,07 ***	19,60 ± 0,77 ***	14,01 ± 1,53 ***
B3T	1,02 ± 0,06	0,97 ± 0,04	12,90 ± 0,44 ***	17,51 ± 2,38 ***	10,38 ± 1,15 ***
GFAP	1,03 ± 0,09	1,06 ± 0,08	54,10 ± 10,06	341,63 ± 47,42 ***	482,18 ± 60,07***

Los valores de expresión fueron obtenidos por RT-qPCR y comparados con la expresión en células de 10 días en flotación, por lo que estaban completamente indiferenciadas. Los datos indican poca variación en las primeras 24h de siembra para dar después lugar a incrementos o descensos dependientes de la variable medida. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados por ANOVA de una vía seguido de Tukey. n=3 experimentos analizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

2.1.4 Expresión de los VGLUTs a nivel de proteína en células precursoras neurales.

En vista de los resultados de RT-qPCR, decidimos evaluar la expresión de proteínas a 3, 7 y 10 días de diferenciación por western blot. En concordancia con los experimentos de expresión de ARNm anteriores, los resultados indican un incremento gradual de la expresión de los VGLUTs; sin embargo los incrementos en la expresión de la proteína fueron de menor magnitud que en el caso del ARNm. La expresión de VGLUT1 es relativamente constante, mostrando un ligero incremento a los 10 días de $1,27 \pm 0,09$ veces respecto al control de 3 días. La de VGLUT2 fue la que se incrementó

más notablemente, alcanzando un valor de $1,41 \pm 0,12$ a los 7 días, que se siguió incrementando a $1,87 \pm 0,18$ a los 10 días y la de VGLUT3 llegó a alcanzar un incremento máximo de $1,65 \pm 0,09$ veces a los 10 días que fue significativo con respecto al control de 3 días, pero no lo fue con respecto a la expresión a los 7 días de diferenciación (Figura 22A-B). Estos resultados indican que parece existir una correlación entre la expresión de los ARNm y su traducción en estas proteínas. Además, es importante considerar que los VGLUTs han sido detectados prácticamente desde el comienzo de la diferenciación, lo que sugiere la posibilidad de que se esté liberando glutamato en el cultivo de CPNs.

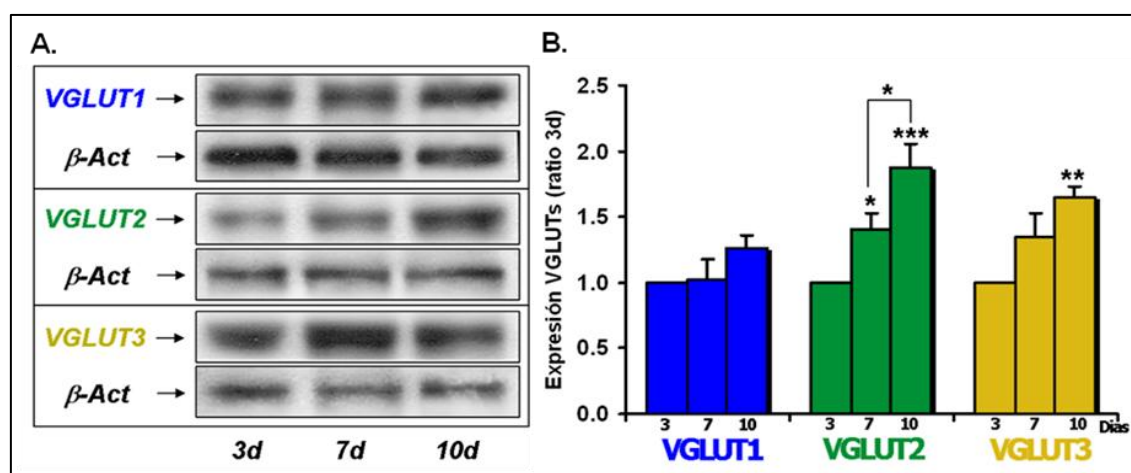


Figura 23: Curso temporal de la expresión de VGLUTs en las CPNs. A: Imágenes representativas de los experimentos de western blot de las CPNs a los 3, 7 y 10 días de diferenciación. B: Análisis semicuantitativo de la expresión de los transportadores VGLUTs en CPNs. Los datos representan las ratios de los valores densitométricos normalizados con β-actina y se expresan como medias±SEM de los valores obtenidos en 4 experimentos de diferentes cultivos. La estadística compara el incremento de la expresión de VGLUTs a los 7 y 10 días de diferenciación sobre los valores de expresión a 3 días (C). *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; ANOVA de una vía seguido de Tukey.

2.1.5 Análisis de la expresión de VGLUTs en distintos fenotipos celulares de las CPNs en cultivo mediante inmunodetección.

El conjunto de resultados de RT-qPCR y western blot indica que existe un incremento progresivo de la expresión de los VGLUTs a lo largo del desarrollo de CPNs que es paralelo a la expresión de los diferentes marcadores de diferenciación. Sin embargo, no deja claro en qué tipos celulares se expresan los diferentes transportadores. Por ello decidimos realizar experimentos de co-detección de los VGLUTs con los marcadores DCX y GFAP para determinar si los transportadores están presentes en neuroblastos, células gliales o en ambos.

La inspección visual de la expresión de los VGLUTs indicó que los transportadores pueden ser detectados en varios tipos celulares independientemente de su morfología de tipo neuronal o glial, en las zonas A y B del cultivo. Sin embargo, el marcaje de las vesículas no permite distinguir con claridad los límites de la membrana de las diferentes células, por lo que es fácil incurrir en el error de contar una

célula más de una vez. Adicionalmente, las células presentes en la zona A presentan un citoplasma muy compacto y entrelazado con otras células, lo cual dificulta una identificación precisa de cada una. Por lo tanto, el análisis de coexpresión se realizó en la zona B contando las células que expresan un marcador de diferenciación y VGLUTs frente al total de células en el cultivo, cuyo número se detectó mediante el marcador de núcleos DAPI. En la Figura 24 podemos observar la detección de vesículas marcadas por anticuerpos anti VGLUT3 en células marcadas con un anticuerpo anti DCX.

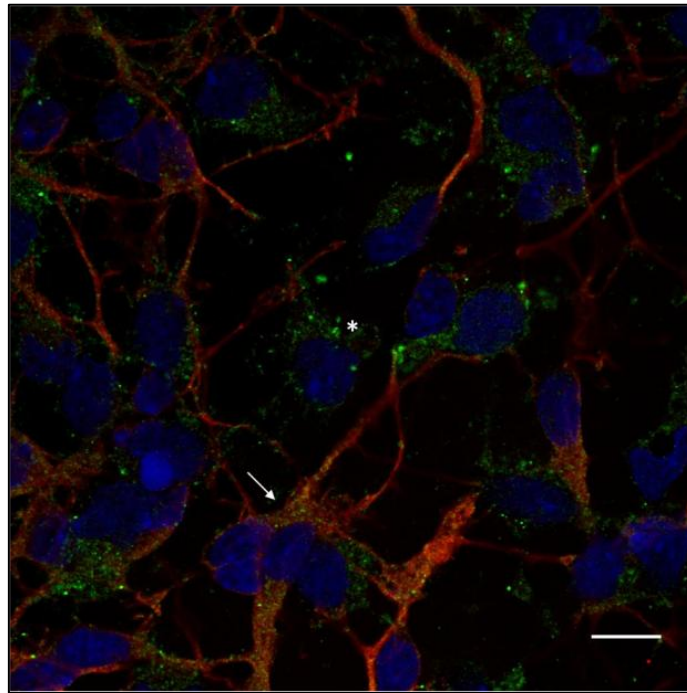


Figura 24: Presencia de VGLUTs en CPNs. Doble inmunomarcaje de DCX (rojo) con VGLUT3 a 3 días de diferenciación. Observamos un patrón punteado, característico de las vesículas de VGLUTs, distribuidas en diferentes tipos celulares. En este caso observamos neuroblastos (flecha) y otras células que no presentan DCX (*), lo que indica que los VGLUTs pueden estar presentes en diferentes tipos celulares *in vitro*. Barra de escala: 10 μ m.

El análisis de los dobles inmunomarcajes entre VGLUTs y DCX reveló que el número de células VGLUT1+DCX+/DAPI se incrementó desde $26,17\% \pm 1,47$ a $37,81\% \pm 7,23$ entre 3 y 7 días de diferenciación (n.s. $P=0,167$) (Figura 25). El número de células doble inmunomarcadas para VGLUT2+DCX+/DAPI se mantuvo en torno al 30% ($30,35\% \pm 4,58$ vs. $29,81\% \pm 5,79$; n.s. $P=0,945$) (Figura 26). Por último, el número de células VGLUT3+DCX+/DAPI+ se incrementó desde $24,51\% \pm 4,07$ a $31,10\% \pm 4,81$ (n.s. $P=0,346$) (Figura 27).

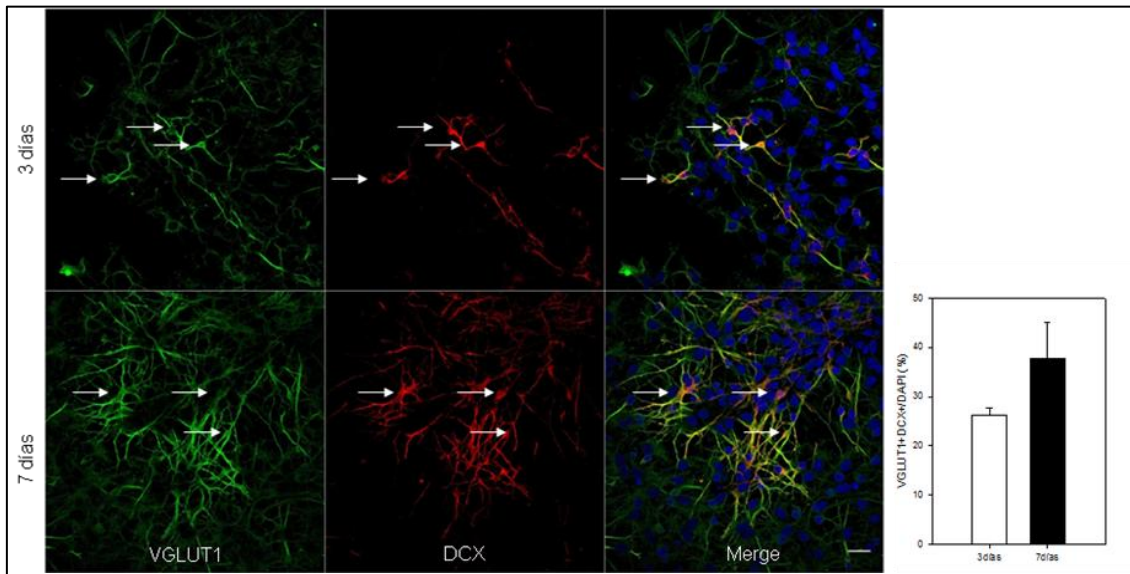


Figura 25: Coexpresión de VGLUT1 y DCX en CPNs a 3 y 7 días de diferenciación. (A-D) VGLUT1, (B-E) DCX, (C-F) Superposición. La cuantificación se realizó mediante conteo de células marcadas e indicó una tendencia ascendente en el número de células que expresan ambos marcadores en los tiempos estudiados, aunque no se llegó a obtener una diferencia significativa (t-Student; $P>0,05$). Se analizaron 150-200 células por imagen. $n=10$ imágenes por día de dos cultivos diferentes. Barra de escala: 20 μm .

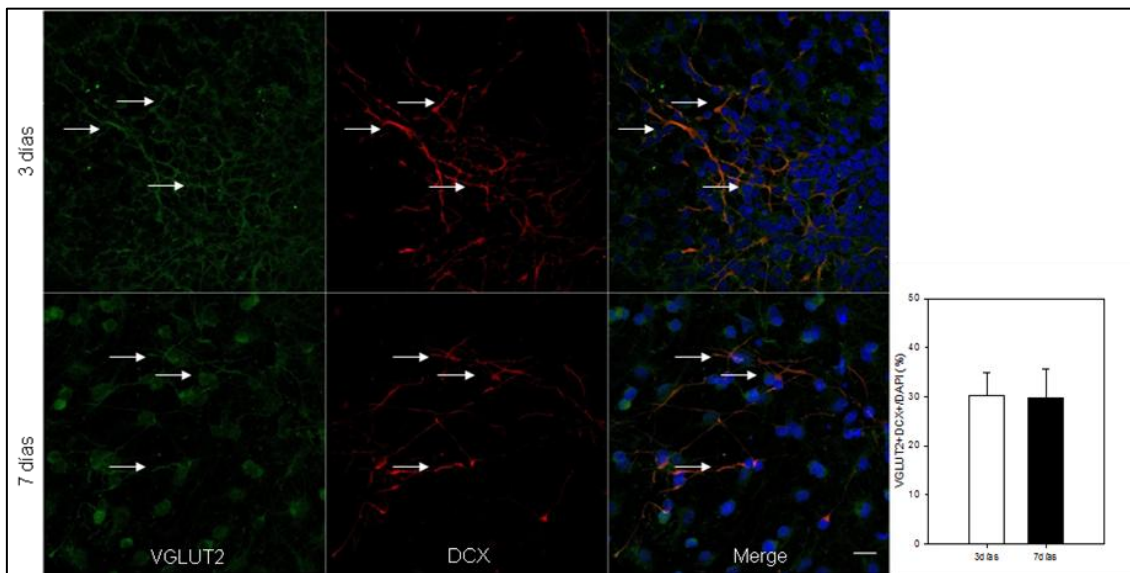


Figura 26: Coexpresión de VGLUT2 y DCX en CPNs a 3 y 7 días de diferenciación. (A-D) VGLUT2, (B-E) DCX, (C-F) Superposición. La cuantificación se realizó mediante conteo de células marcadas e indicó que el número de células que expresan ambos marcadores no varía en los tiempos estudiados (t-Student; $P>0,05$). Se analizaron 150-200 células por imagen. $n=10$ imágenes por día de dos cultivos diferentes. Barra de escala: 20 μm .

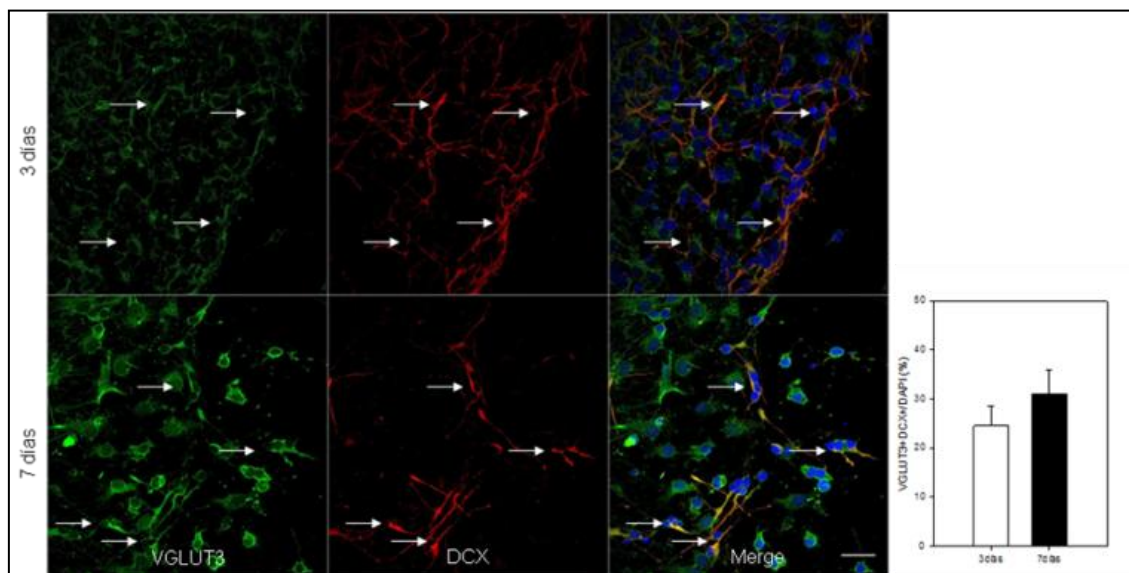


Figura 27: Coexpresión de VGLUT3 y DCX en CPNs a 3 y 7 días de diferenciación. (A-D) VGLUT3, (B-E) DCX, (C-F) Superposición. La cuantificación se realizó mediante conteo de células marcadas e indicó una tendencia ascendente en el número de células que expresan ambos marcadores en los tiempos estudiados, aunque no se llegó a obtener una diferencia significativa (t-Student; $P>0,05$). Se analizaron 150-200 células por imagen. $n=10$ imágenes por día de dos cultivos diferentes. Barra de escala: 20 μm .

El estudio inmunocitoquímico de la co-expresión de GFAP contra VGLUTs indicó que entre 3 y 7 días de diferenciación el número de células VGLUT1+GFAP+/DAPI se redujo de un $27,08 \pm 3,01$ % a un $10,45 \pm 2,47$ % ($P<0,01$) (Figura 28) y el de VGLUT2+GFAP+/DAPI de un $52,38 \pm 4,884$ % a un $26,44 \pm 3,862$ % ($P<0,01$) (Figura 29). Por el contrario, el número de células VGLUT3+GFAP+/DAPI no presentó ningún cambio significativo ($46,76 \pm 9,16$ % frente a $53,66\% \pm 8,17$; $P>0,05$) (Figura 30).

Todos los resultados fueron comprobados realizando controles negativos en los que se eliminaron los anticuerpos primarios de todos los marcadores estudiados (Figura 31), indicando que los anticuerpos secundarios fueron específicos. Estos resultados, en conjunto, indican que entre 3 y 7 días de diferenciación existe una preferencia por la expresión de VGLUT3 en células gliales frente a VGLUT1 y 2, mientras que en neuroblastos parece manifestarse una preferencia por la expresión de VGLUT1 y 3. Dado que en los tiempos seleccionados esta tendencia no llegó a alcanzar significación, es posible que en un cultivo más maduro, por ejemplo de 10 o 15 días de diferenciación, las diferencias observadas sean más claras.

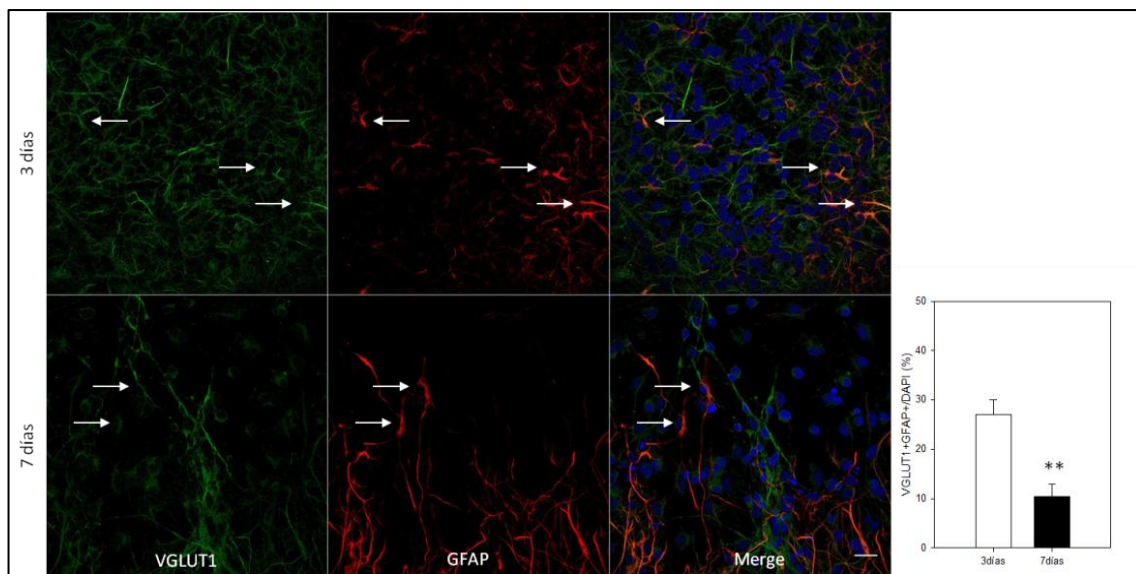


Figura 28: Coexpresión de VGLUT1 y GFAP en CPNs a 3 y 7 días de diferenciación. (A-D) VGLUT1, (B-E) GFAP, (C-F) Superposición. La cuantificación se realizó mediante conteo de células marcadas y una reducción estadísticamente significativa en el número de células que expresan ambos marcadores en los tiempos estudiados (t-Student; $p < 0,01$). Se analizaron 150-200 células por imagen. $n=10$ imágenes por día de dos cultivos diferentes. Barra de escala: 20 μm .

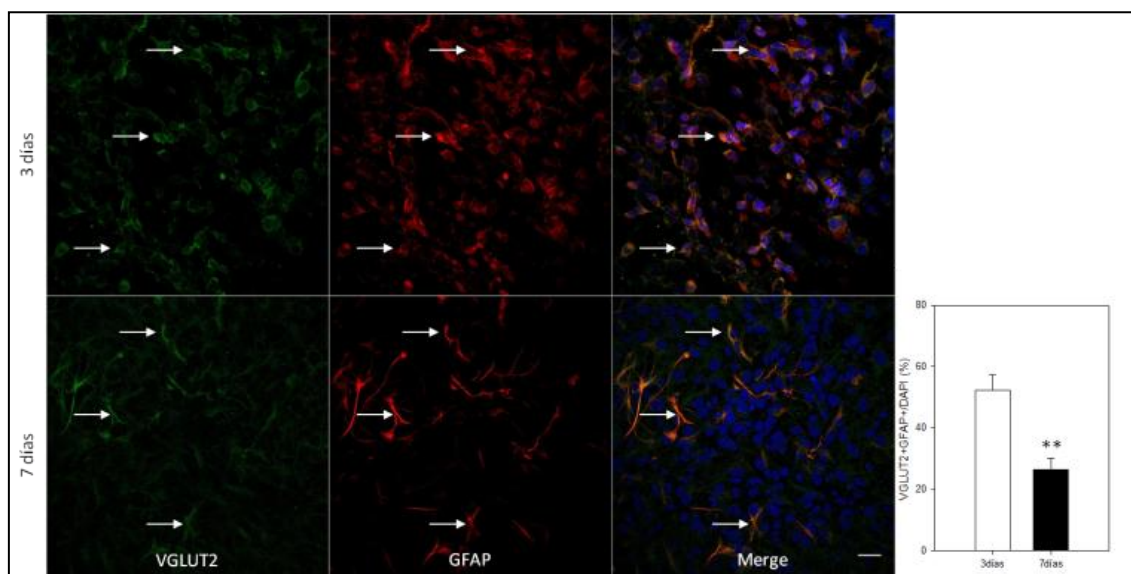


Figura 29: Coexpresión de VGLUT2 y GFAP en CPNs a 3 y 7 días de diferenciación. (A-D) VGLUT2, (B-E) GFAP, (C-F) Superposición. La cuantificación se realizó mediante conteo de células marcadas y una reducción estadísticamente significativa en el número de células que expresan ambos marcadores en los tiempos estudiados (t-Student; $p < 0,01$). Se analizaron 150-200 células por imagen. $n=10$ imágenes por día de dos cultivos diferentes. Barra de escala: 20 μm .

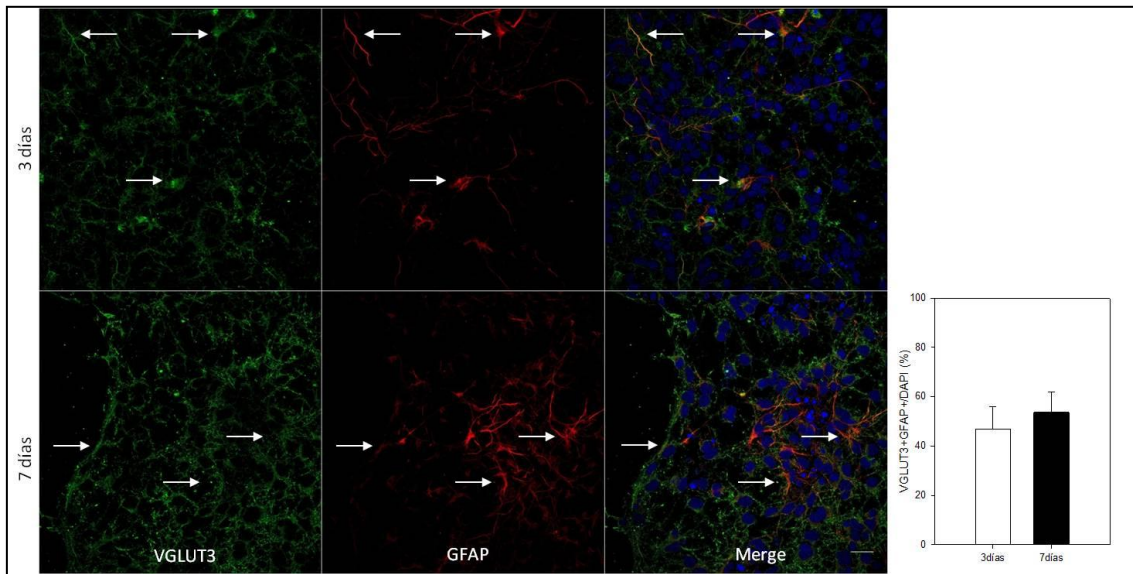


Figura 30: Coexpresión de VGLUT3 y GFAP en CPNs a 3 y 7 días de diferenciación. (A-D) VGLUT3, (B-E) GFAP, (C-F) Superposición. La cuantificación se realizó mediante conteo de células marcadas y no indicó diferencias significativas en el número de células que expresan ambos marcadores en los tiempos estudiados (t-Student; $p > 0,05$). Se analizaron 150-200 células por imagen. $n=10$ imágenes por día de dos cultivos diferentes. Barra de escala: 20 μm .

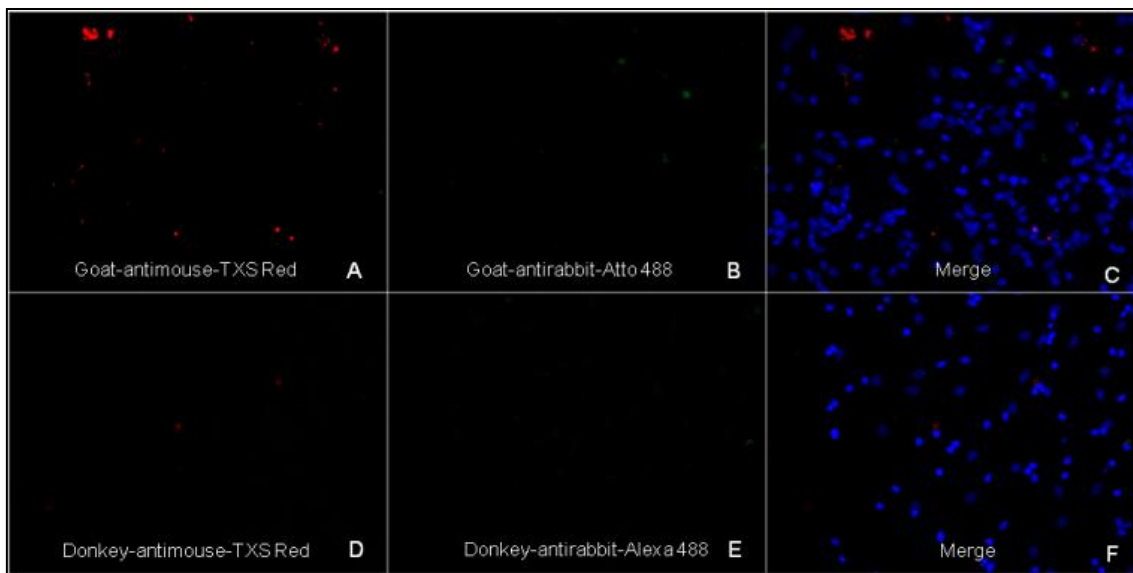


Figura 31: Controles negativos de las inmunofluorescencias anteriores. Se repitieron las inmunodetecciones omitiendo los anticuerpos primarios de GFAP (A), DCX (D) y VGLUTs (B, E) sin detectar colocalización de la señal. C,F) Mezcla de las señales A, B y D, E respectivamente.

Para comprobar los resultados del recuento de células obtenidos mediante las inmunodetecciones realizamos un estudio de correlación de intensidad de señales. Este método compara la intensidad de la señal verde, en este caso de los VGLUTs, contra la

de la señal roja (DCX o GFAP), determinando si la intensidad de ambas señales varía en paralelo y calculando cuándo la señal amarilla, producto de la mezcla de las dos anteriores, se hace más intensa (Li et al., 2004). La correlación se calcula mediante el coeficiente de Pearson.

Este procedimiento confirmó parcialmente el resultado del recuento de células. En la Figura 30 se muestran las gráficas de correlación de intensidades, así como el valor medio de la correlación de Pearson obtenido para cada par. Así pues el incremento del número de células que expresan VGLUT1 presenta una correlación positiva con el incremento entre 3 y 7dd de las que expresan DCX ($0,61 \pm 0,011$ vs $0,76 \pm 0,02$; $P < 0,001$. Figura 32 A,B). La correlación entre el número de células que expresan VGLUT2 y DCX no muestra diferencias significativas entre 3 y 7dd ($0,51 \pm 0,055$ vs. $0,37 \pm 0,055$; $P > 0,05$. Figura 32 E,F). Por último, existe una correlación positiva entre el incremento en la expresión de VGLUT3 y la de DCX en el mismo período, aunque, como en el caso del recuento de células, esta correlación tampoco llega a ser significativa ($0,47 \pm 0,035$ vs. $0,54 \pm 0,026$; $P > 0,05$. Figura 32 I,J). Este análisis, por tanto, valida el realizado mediante el recuento de células, aunque sólo aporta significación en el caso de la correlación entre los incrementos de VGLUT1 y DCX.

El análisis de correlación entre la expresión de VGLUTs y GFAP entre 3 y 7 días confirmó la disminución de la coexpresión con el tiempo entre VGLUT1/GFAP ($0,51 \pm 0,043$ vs. $0,33 \pm 0,029$; $P < 0,05$. Figura 32 C, D) y VGLUT2/GFAP ($0,78 \pm 0,027$ vs. $0,52 \pm 0,099$; $P < 0,05$. Figura 32 G,H), mientras que la diferencia entre la correlación positiva entre los incrementos de expresión de VGLUT3 y GFAP no fue estadísticamente significativa entre estos dos puntos temporales ($0,68 \pm 0,06$ vs. $0,55 \pm 0,047$; $P > 0,05$. Figura 32 K,L).

En resumen, los resultados obtenidos mediante la combinación de los dos métodos de análisis anteriores indica que efectivamente los VGLUTs se expresan en neuroblastos y células gliales, en diferentes proporciones dependiendo del tiempo de diferenciación del cultivo. Curiosamente a pesar de que los datos de RT-qPCR y western blot indican que hay un aumento constante en su nivel de expresión, hemos visto cómo hay un proceso de especialización temporal en el fenotipo de célula que presenta los VGLUTs. Así pues, los VGLUTs parecen ser más ubicuos en las fases iniciales de la diferenciación, mientras que a medida que el cultivo madura VGLUT1 y 3 muestran una tendencia a hacerse más evidentes en neuroblastos, a diferencia de la expresión de VGLUT2 parece mantenerse constante en neuroblastos pero no en células gliales. Sin embargo, mientras que ambos análisis indican claramente que VGLUT1 y 2 se reducen en células gliales, el recuento de células sugiere que VGLUT3 se mantiene constante en éstas células. Por lo tanto, existe la posibilidad de que inicialmente el glutamato actúe como una señal trófica o de supervivencia liberada por neuroblastos y glia inmadura, mientras que en un cultivo maduro el glutamato podría funcionar como neurotransmisor liberado desde neuroblastos a través de VGLUT1, 2 o 3 o como gliotransmisor liberado desde astrocitos a través de VGLUT3.

Esta metodología tiene como contratiempo que se analizan imágenes obtenidas de un campo escogido por el investigador. Como se desprende de la imagen mostrada en la Figura 19, la distribución de las CPNs en los cristales no es homogénea. Por lo tanto el investigador debe escoger, en el momento de capturar las imágenes, aquellos

campos que parecen tener una abundancia semejante de células de interés. Para obtener un resultado que caracterice aún mejor la presencia de los VGLUTs en las CPNs será necesario utilizar la citometría de flujo. Ésta técnica permitirá evaluar la expresión de los transportadores en todas las células del cultivo sin tener en cuenta su distribución espacial.

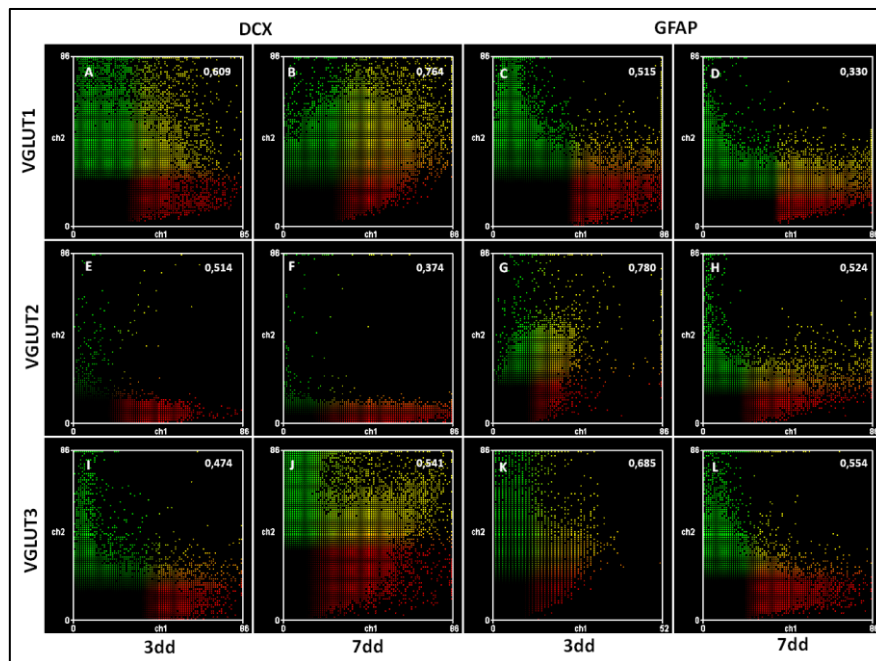


Figura 32: Análisis de los resultados de coexpresión entre VGLUTs/DCX o VGLUTs/GFAP mediante un análisis informático de correlación de las señales. La técnica analiza las intensidades de las señales verdes y rojas e indica en el cuadrante superior derecho si varían en conjunto (amarillo) mediante la correlación de Pearson. Se analizaron 10 imágenes de 2 cultivos diferentes a 3 y 7 días de diferenciación. La media del coeficiente de pearson de ambos puntos temporales fue comparado mediante la t-Student. Observamos un incremento significativo de la correlación VGLUT1/DCX (A,B) entre 3 y 7 días ($P<0,001$) mientras que no hay diferencia en las correlaciones VGLUT2/DCX (E,F) o VGLUT3/DCX (I,J) en ambos tiempos. Encontramos una disminución significativa en las correlaciones VGLUT1/GFAP (C,D) y VGLUT2/GFAP ($P<0,05$) (G,H), pero no encontramos variación en la correlación VGLUT3/GFAP (K,L).

2.2 Regulación de la expresión de VGLUTs en CPNs de la SVZ por distintos estímulos

2.2.1 Efecto del tratamiento con agonistas de los receptores metabotrópicos de glutamato.

Tras haber demostrado por tres aproximaciones experimentales diferentes la expresión de los VGLUTs y EAATs en las CPNs decidimos examinar la posibilidad de que el glutamato liberado por la neuronas durante la isquemia cerebral o en el periodo post-isquémico, o según nuestros resultados previos (apartado 1.4) el posiblemente liberado por los astrocitos reactivos del CCI, pudiera tener algún efecto sobre la diferenciación de las CPNs, y así sobre el proceso de neurogénesis que tiene lugar tras la isquemia. Puesto que está descrito que durante el período de reperusión el glutamato se mantiene elevado durante un tiempo (Campos et al., 2011b), y que evidencias previas de otros autores han demostrado que este neurotransmisor está implicado en la supervivencia de los neuroblastos en condiciones normales y

patológicas (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; Castiglione et al., 2008; Platel et al., 2010a), así como en la liberación de factores tróficos que favorecen su supervivencia (Jean et al., 2008; Mattson, 2008), quisimos determinar si estos efectos del glutamato podrían explicarse a través de la alteración de la expresión en los sistemas de transporte para este neurotransmisor, VGLUTs y EAATs. Está descrito que esta acción del glutamato está mediada, a nivel basal, por algunos receptores tanto ionotrópicos (NMDA) (Platel et al., 2010a), como metabotrópicos (mGluR5) (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005), decidimos evaluar, en primer lugar, el efecto de la activación del receptor metabotrópico mGluR5 sobre la neurogénesis de la SVZ, dado que dicho receptor activa diversas vías de señalización intracelular que pueden llevar a la activación de la expresión génica durante un tiempo prolongado. De hecho Di Giorgi-Gerevini et al. (2005) han mostrado que la depleción de este receptor disminuye el número de neuroblastos presentes en el CCI durante la reperusión en un modelo de isquemia transitoria. Además, la inhibición *in vitro* del receptor mGluR5 induce apoptosis en progenitores neurales de neuronas, mientras que la inhibición del receptor mGluR1 bloquea el ciclo celular e induce a la neurodiferenciación (Castiglione et al., 2008).

Cada transportador respondió de manera diferente a los tratamientos, lo cual sugiere diferentes mecanismos de regulación de la expresión. DHPG 1 y 100 μ M indujo la sobre expresión de VGLUT1 mientras que DHPG 10 μ M tuvo un efecto inductor más leve que no llega a ser significativo. El glutamato 2mM indujo la expresión de VGLUT1 en la misma proporción que DHPG 1 y 10 μ M. Por el contrario VGLUT2 sólo se incrementó por la dosis más alta de DHPG, mientras que glutamato 2mM parece reprimir su expresión aunque en nuestro caso no hemos encontrado una diferencia significativa. DHPG 1 μ M fue la dosis más eficiente en la inducción de la expresión de VGLUT3, mientras que DHPG 10 μ M también aumentó la expresión del transportador aunque sin llegar a un nivel significativo. El glutamato 2mM también aumentó notablemente la expresión de VGLUT3. Por lo tanto el glutamato puede estar actuando como inductor de la expresión de los VGLUTs a través del receptor mGluR5 (Figura 33 A-C; Tabla 10).

Curiosamente en este experimento observamos una reducción generalizada de la expresión de los transportadores EAATs. EAAT1 mostró una tendencia a disminuir con todos los tratamientos a pesar de no alcanzar un nivel significativamente menor, mientras que EAAT2 se redujo significativamente con DHPG 100 μ M y glutamato 2mM. El efecto sobre la expresión de EAAT3 no queda claro. DHPG 1 μ M no alteró la expresión del transportador, mientras que DHPG 10 μ M indujo un leve incremento significativo y DHPG 100 μ M y glutamato 2mM por el contrario redujeron su expresión. Por lo tanto el glutamato puede estar actuando como represor de la expresión de los EAATs a través del receptor mGluR5. El aumento de EAAT3 con la dosis 10 μ M a pesar de ser significativa es pequeña comparada, por ejemplo, con los incrementos observados para los VGLUTs (RQ en torno a 2). Por lo tanto es un resultado cuestionable y se necesita más experimentación para aclarar lo que ocurre con este transportador (Figura 33 D-E; Tabla 10).

Los tratamientos parecen disminuir la expresión de Nestina, aunque únicamente DHPG 100 μ M produce una reducción significativa, mientras que DHPG 1, 10 y 100 μ M y glutamato 2mM aumentaron la expresión de DCX. DHPG 1, 10 y 100 μ M

y glutamato 2mM aumentaron notablemente la expresión de GFAP. Curiosamente en este caso todas las dosis de DHPG fueron más efectivas en la inducción de la expresión de GFAP que glutamato 2mM. Por lo tanto la activación del receptor mGluR5 a través de su agonista específico induce levemente la diferenciación de neuroblastos pero parece fomentar más la diferenciación de células gliales. Por otro lado glutamato 2mM induce la expresión de DCX al mismo nivel que dosis bajas e intermedias de DHPG, mientras que es menos potente que el DHPG en la inducción de diferenciación de células gliales (Figura 33 G-I; Tabla 10).

Dado que el tratamiento agudo con DHPG y glutamato ha aumentado la expresión de VGLUTs y reducido levemente la expresión de EAATs, a la par de la inducción de la expresión de DCX y sobre todo GFAP, esto sugiere la posibilidad de que el glutamato pueda fomentar transitoriamente su propia liberación desde neuroblastos o células gliales y que esto tenga un efecto proneurogénico y progliogénico.

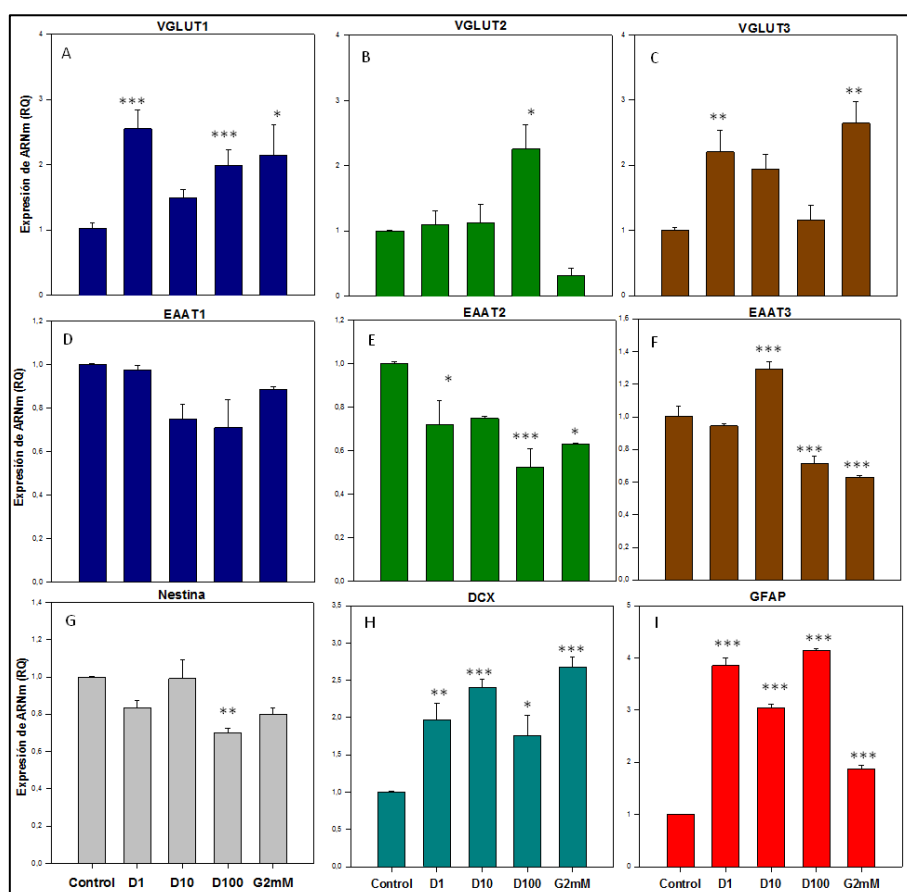


Figura 33: Efecto de la estimulación del receptor mGluR5 sobre la expresión del ARNm de VGLUTs en CPNs. A-C) VGLUT1-3. B) EAATs 1-3. G-I) Variables de neurogénesis. Las CPNs fueron sembradas y estimuladas con DHPG a concentraciones de 1,10 y 100 μ M o con glutamato 2 mM y luego se recuperaron del estímulo durante 3 días. DHPG indujo la expresión de los VGLUTs y redujo la expresión de EAATs a la vez que promovió una reducción de Nestina y un incremento de DCX y GFAP. Esto indica que el receptor mGluR5 puede favorecer la diferenciación en paralelo con la sobre expresión de VGLUTs. El Glutamato 2mM causó la sobre expresión de VGLUT1 y 3 y la reducción de EAAT2 y 3 además de promover la expresión de DCX y GFAP. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados mediante ANOVA de una vía seguida de Tukey. n=3 experimentos analizados por triplicado. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Tabla 10. Efecto de la estimulación aguda de CPNs durante 24h con las dosis indicadas de DHPG o glutamato 2mM y 3 días de recuperación.

Genes	Control	DHPG (μ M)			Glutamato
		1	10	100	2mM
VGLUT1	1,02 \pm 0,09	2,55 \pm 0,30 ***	1,49 \pm 0,13	1,99 \pm 0,23 ***	2,15 \pm 0,50 *
VGLUT2	1 \pm 0,01	1,01 \pm 0,22	1,12 \pm 0,30	2,26 \pm 0,37 *	0,32 \pm 0,11
VGLUT3	1,004 \pm 0,04	2,20 \pm 0,33 **	1,95 \pm 0,22	1,16 \pm 0,23	2,65 \pm 0,33 **
EAAT1	1 \pm 0,004	0,98 \pm 0,02	0,75 \pm 0,06	0,71 \pm 0,13	0,89 \pm 0,01
EAAT2	1 \pm 0,007	0,72 \pm 0,111	0,75 \pm 0,01	0,52 \pm 0,09 ***	0,63 \pm 0,01 *
EAAT3	1,001 \pm 0,04	0,94 \pm 0,01	1,29 \pm 0,02 ***	0,71 \pm 0,02 ***	0,63 \pm 0,01 ***
Nestina	1 \pm 0,003	0,83 \pm 0,04	0,99 \pm 0,10	0,7 \pm 0,02 **	0,80 \pm 0,03
DCX	1 \pm 0,01	1,97 \pm 0,22 **	2,40 \pm 0,10 ***	1,76 \pm 0,30 *	2,67 \pm 0,14 ***
GFAP	1 \pm 0,008	3,85 \pm 0,152 ***	3,05 \pm 0,06 ***	4,14 \pm 0,04 ***	1,88 \pm 0,06 ***

Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados con el control por ANOVA de una vía seguida de Tukey. n=3 experimentos analizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

2.2.2 Regulación de la expresión de los VGLUTs y EAATs por medios condicionados de neuronas y astrocitos sometidos a privación de oxígeno y glucosa (POG)

Tras haber demostrado la presencia de los transportadores vesiculares y de membrana de glutamato en las CPNs, decidimos averiguar si un protocolo de isquemia *in vitro*, como lo es la privación de oxígeno y glucosa (POG), podría alterar su patrón de expresión a nivel de ARNm y si estos cambios en la expresión podrían relacionarse con el proceso de diferenciación de precursores neurales. Para el diseño de estos experimentos tuvimos en cuenta que en una situación *in vivo* la SVZ está fuera del área de influencia del infarto. Típicamente, una lesión como la inducida por los métodos de filamento intraluminal o ligadura de la arteria cerebral media afectan a la corteza somatosensorial y al estriado (Hossmann, 2006). Por lo tanto para simular mejor la respuesta de las CPNs a la isquemia decidimos no aplicar directamente la POG sobre las neuroesferas sino servirnos de un modelo de medios condicionados. En esta aproximación experimental una estructura o tipo celular que se sospeche que pueda tener algún tipo de influencia sobre la proliferación y/o diferenciación de las CPNs es sometido a un estímulo de interés. Si el estímulo induce la liberación de sustancias difusibles, éstas quedarán concentradas en el medio de cultivo, que puede ser recogido y posteriormente usado para estimular a las CPNs. En este sentido, diferentes grupos de investigación han demostrado que las CPNs pueden responder a factores difusibles liberados desde la corteza cerebral en respuesta a un estímulo inductor de apoptosis como la estaurosporina (Agasse et al., 2004), o que las células endoteliales pueden aumentar la proliferación celular o inducir la diferenciación de neuronas a partir de CPNs *in vitro* (Qin Shen et al., 2004; Plane et al., 2010) sin necesidad de mantener un contacto físico con éstas. Aún así, es importante resaltar que otros investigadores también han utilizado la hipoxia *in vitro* directamente sobre las neuroesferas en

flotación para estudiar su efecto a nivel de proliferación o diferenciación entre otros aspectos (Chen et al., 2010; Santilli et al., 2010).

Con estas premisas generamos dos tipos de medios condicionados obtenidos en células sometidas a POG: Medio condicionado procedente de neuronas (POGn) y medio condicionado obtenido de astrocitos (POGa). En ambos casos se utilizó como control un medio procedente de los mismos tipos celulares pero no sometidos a POG.

Para simplificar la interpretación de resultados hemos centrado el análisis de diferenciación en la expresión de Nestina, DCX y GFAP. Como muestran nuestros resultados anteriores en el estudio del curso temporal de la expresión de marcadores de neurogénesis (apartado 2.1.3) a medida que aumenta el período de diferenciación de las CPNs, la expresión de DCX y GFAP aumentan significativamente, mientras que la de Nestina se reduce. Un retraso en la evolución de estos parámetros sería considerado como una interrupción del proceso de diferenciación. Por otro lado, si la evolución de DCX y GFAP se mantiene pero observamos un incremento de Nestina, esto podría interpretarse como un aumento en la proliferación de CPNs paralelo a la diferenciación celular.

2.2.2.1 Regulación de la expresión de los VGLUTs y EAATs en CPNs por medios condicionados de neuronas sometidas a privación de oxígeno y glucosa (POG)

En las células tratadas con medio control, la expresión de VGLUT1 fue ligeramente inferior a 3 días de diferenciación que a 6 aunque no llegó a haber una diferencia significativa. Sin embargo, la de VGLUT2 sí mostró un incremento muy notable en los mismos puntos temporales. La expresión de VGLUT3 también presentó un incremento significativo aunque más discreto que el anterior. La exposición al medio POGn redujo la expresión de VGLUT1 a 3 días de diferenciación respecto a su control, aunque esta diferencia no llegó a ser significativa. Sin embargo, esta reducción fue muy superior a los 6 días de diferenciación (Figura 34 A; Tabla 11). De la misma forma, la expresión de VGLUT2 se redujo, de forma significativa frente a sus controles respectivos, tanto a 3 como, de forma mucho más acusada, a 6 días de diferenciación (Figura 34B; Tabla 11). Por último, el tratamiento con medio POGn incrementó ligeramente, aunque de forma no significativa, la expresión de VGLUT3 a 3 días de diferenciación, mientras que a 6 días la expresión de VGLUT3 fue menor que la de su control, equiparándose a la del control de 3 días (Figura 34C, Tabla 11). De estos resultados se puede concluir que el medio control de neuronas no altera el patrón de expresión de VGLUTs, mientras que el medio POGn reprime la expresión del ARNm de los transportadores vesiculares de glutamato a largo plazo.

En el caso de los EAATs, tal y como sugiere el resultado del curso temporal (ver apartado 2.1.2), la expresión de EAAT1 no muestra diferencias entre ambos medios control. La expresión de EAAT2 muestra una tendencia a aumentar aunque la diferencia no fue significativa en este caso. Por último, la de EAAT3 tampoco mostró diferencias de expresión entre ambos puntos temporales. El medio POGn no indujo alteraciones en la expresión de EAAT1 respecto a sus controles a 3 y 6 días (Figura 34D; Tabla 11). La expresión de EAAT2 se incrementó ligeramente a 3 días de diferenciación, pero se equiparó a su control a los 6 días (Figura 34E; Tabla 11). Por último, el medio POGn aumentó ligeramente la expresión de EAAT3 a 3 días, pero

dicha inducción fue transitoria ya que a los 6 días de diferenciación no observamos diferencias significativas en la expresión del transportador con los dos controles (Figura 34F; Tabla 11). Por lo tanto, el medio control no altera el patrón de expresión de los EAATs, mientras que el medio OGDn induce un leve incremento transitorio de EAAT2 y 3 que se pierde antes de los 6 días de diferenciación.

Con respecto a los marcadores de neurogénesis, el medio control no alteró la tendencia de disminución, aunque no significativa, en la expresión de Nestina entre 3 y 6 días, mientras que la expresión de DCX y GFAP se incrementó paralelamente en los mismos puntos temporales. Sin embargo, el medio POGn indujo un leve incremento no significativo en la expresión de Nestina a los 3 días de diferenciación, que no se mantuvo en el tiempo. El medio POGn sí indujo la expresión de DCX a tres días de diferenciación equiparándola al control de 6 días. A 6 días de diferenciación la expresión de DCX en las células expuestas al medio POGn es igual a la del control de 3 días y menor que la del control de 6 pero sin llegar a una diferencia significativa. Claramente la expresión de DCX es mayor en las células expuestas al medio POGn a 3 días que a 6 días de diferenciación. Finalmente, el medio POGn aumentó la expresión de GFAP a 3 días de diferenciación, aunque de forma no estadísticamente significativa. Sin embargo, este incremento no se mantuvo a los 6 días de diferenciación en las células expuestas al medio POGn ya que se equipararon a su control. Por lo tanto el medio control no altera la tendencia a disminuir de Nestina, ni de aumentar de DCX y GFAP, indicando que no altera la diferenciación, sin embargo el medio POGn acelera ligeramente la diferenciación de neuroblastos y glía a 3 días de diferenciación (Figura 34 G-I; Tabla 11).

Tabla 11. Efecto de la exposición de las CPNs a medio condicionado por neuronas control o sometidas a isquemia *in vitro*.

Tiempo	24h exposición + 3 días		24h exposición + 6 días	
Condiciones	Neuronas control	POGn	Neuronas control	POGn
Genes				
VGLUT1	1,01 ± 0,04	0,68 ± 0,16 ^{ooo}	1,46 ± 0,17	0,59 ± 0,07 *** ^{ooo}
VGLUT2	0,93 ± 0,13	0,41 ± 0,18 *** ^{ooo}	6,99 ± 1,10 ***	0,47 ± 0,087 *** ^{ooo}
VGLUT3	1,00 ± 0,02	1,29 ± 0,14	1,58 ± 0,13 **	1,03 ± 0,09 \$\$
EAAT1	1,00 ± 0,01	1,18 ± 0,06	1,01 ± 0,13	0,84 ± 0,13
EAAT2	1,00 ± 0,02	1,96 ± 0,29 *	1,59 ± 0,28 *	1,55 ± 0,06
EAAT3	1,002 ± 0,03	1,35 ± 0,08 * \$	0,97 ± 0,10	1,11 ± 0,08
Nestina	1,01 ± 0,02	1,30 ± 0,37	0,60 ± 0,10	0,64 ± 0,17
DCX	0,99 ± 0,05	1,85 ± 0,17 **	1,50 ± 0,15	1,10 ± 0,13
GFAP	1,04 ± 0,04	1,94 ± 0,26	2,42 ± 0,38 *	2,46 ± 0,35 *

Los medios fueron condicionados durante 12h y las CPNs fueron expuestas a estos medios durante 24h para luego recuperarse durante 3 o 6 días. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados con los controles por ANOVA de una vía seguida de Tukey. n=2 experimentos analizados por triplicado. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. * Diferencia con el control de 3 días. \$ Diferencia con el control de 6 días.

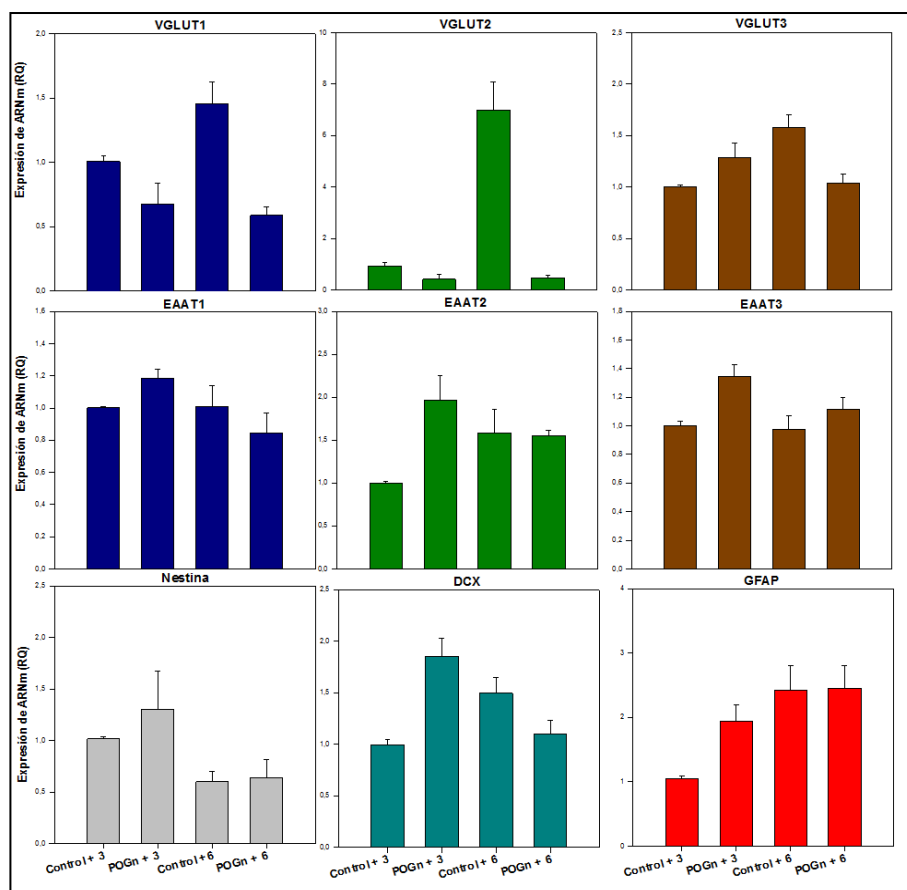


Figura 34: Efecto de la exposición de un cultivo de CPNs a medio condicionado por neuronas control o sometidas a POG (POGn). A-C) VGLUT1, 2 y 3. D-F) EAAT1, 2 y 3. G-I) Variables de neurogénesis. El medio control no afecta a las diferentes variables, mientras que el medio POGn reprime la expresión de VGLUT1 y 2 y promueve levemente la expresión de EAAT2 y 3, DCX y GFAP a 3 días de diferenciación. n = 2 experimentos analizados por triplicado. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados mediante ANOVA de una vía. * $P < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. * Diferencia con el control de 3 días. \$ Diferencia con el control de 6 días.

2.2.2.2 Regulación de la expresión de los VGLUTs y EAATs por medios condicionados de astrocitos sometidos a privación de oxígeno y glucosa (POG)

A diferencia del caso anterior, el medio control de astrocitos sí alteró el patrón esperado de expresión de algunas variables. La expresión de VGLUT1 fue mayor en el control de 3 que en el control de 6 días, aunque de forma no estadísticamente significativa, mientras que la expresión de VGLUT2 presentó una diferencia mucho más notable en los mismos puntos temporales. Sin embargo, el medio control no alteró la tendencia normal de expresión de VGLUT3 (Figura 34 A-C, Tabla). La exposición al medio POGa aumentó muy notablemente la expresión de VGLUT1 a 3 días de diferenciación respecto a los controles de 3 y 6 días, sin embargo a 6 días de diferenciación la expresión de VGLUT1 se equipara a los dos controles. Por el contrario, la expresión de VGLUT2, que también aumentó de forma muy significativa por la exposición al medio POGa a 3 mantuvo el incremento a los 6 días. El tratamiento con el medio POGa también incrementó la expresión de VGLUT3 a los 3 días de diferenciación equiparándola al control de 6 días. Sin embargo, a 6 días de

diferenciación se apreció una disminución significativa frente al control de 6 días aunque la expresión sigue siendo superior al control de 3 días (Figura 35 A-C, Tabla 12). Por lo tanto, el medio control de astrocitos reprime la expresión de VGLUT1 y 2, pero no la de VGLUT3, mientras que el medio POGa induce muy notablemente la expresión de VGLUT1 a 3 días de diferenciación y la de VGLUT2 a 3 y 6 días de diferenciación.

Tabla 12. Efecto de la exposición de las CPNs al medio condicionado por neuronas control o sometidas a isquemia in vitro.

Tiempo	24h exposición + 3 días		24h exposición + 6 días	
Condiciones	Astrocitos control	POGa	Astrocitos control	POGa
Genes				
VGLUT1	0,98 ± 0,02	10,35 ± 0,30 *** °°°	0,45 ± 0,02	0,67 ± 0,20
VGLUT2	1,01 ± 0,04	5,05 ± 0,30 *** °°°	0,14 ± 0,06 **	3,05 ± 0,41 *** °°°
VGLUT3	1,03 ± 0,11	3,10 ± 0,25 ***	3,97 ± 0,21 ***	2,72 ± 0,27 *** °°
EAAT1	1 ± 0,005	0,89 ± 0,10	0,87 ± 0,07	1,14 ± 0,20
EAAT2	1,00 ± 0,02	1,60 ± 0,132 *** °°°	0,85 ± 0,03	2,98 ± 0,23 *** °°°
EAAT3	1,00 ± 0,03	1,04 ± 0,04 °°°	0,65 ± 0,02 ***	0,70 ± 0,10 ***
Nestina	1 ± 0,01	0,88 ± 0,136	0,88 ± 0,12	0,98 ± 0,06
DCX	1,00 ± 0,02	1,7 ± 0,05 *** °°°	0,64 ± 0,05 ***	1,82 ± 0,14 *** °°°
GFAP	1,01 ± 0,04	0,76 ± 0,06	1,02 ± 0,03	1,56 ± 0,22 * °

Los medios fueron condicionados durante 12h y las CPNs fueron expuestas a estos medios durante 24h para luego recuperarse durante 3 o 6 días. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados con los controles por ANOVA de una vía seguida de Tukey. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. * Diferencia con el control de 3 días. ° Diferencia con el control de 6 días.

La expresión de EAAT1 y EAAT2 no experimentó variaciones significativas entre 3 y 6 días por exposición de las CPNs al medio control de astrocitos. Sin embargo, la de EAAT3 sufrió una reducción significativa entre 3 y 6 días tras la exposición a este medio. Curiosamente la exposición al medio POGa no modificó el patrón de expresión de EAAT1 e indujo un incremento paulatino de EAAT2 a 3 días y 6 días de diferenciación. Es importante destacar que el incremento en la expresión de EAAT2 inducido por el medio POGa es significativamente mayor a 6 días que a 3 (P<0,001). Por el contrario, la expresión de EAAT3 no se alteró por el tratamiento con medio POGa ya que no existen diferencias significativas con los respectivos controles. Por lo tanto, el medio condicionado control de astrocitos no altera la expresión de EAAT1 y 3, pero reprime la expresión de EAAT2. Por el contrario, el medio POGa tampoco altera la expresión de EAAT1 y 3, pero sí induce un incremento dependiente del tiempo en la expresión de EAAT2 (Figura 35 D-F, Tabla 12).

Por último, en lo que respecta a las variables de neurogénesis, el medio control de astrocitos no indujo cambios significativos en la expresión de Nestina, ni de GFAP. Por el contrario, la expresión de DCX se redujo significativamente a los 6 días de

diferenciación. El medio POGa tampoco indujo alteraciones significativas en la expresión de Nestina, pero incrementó significativamente la expresión de DCX a 3 días y 6 días respecto a los controles de estos tiempos. Por último el medio POGa no indujo cambios en la expresión de GFAP a 3 días de diferenciación, pero incrementó la expresión de esta proteína a los 6 días de diferenciación (Figura 35 G-I, Tabla 12).

Por lo tanto el medio control de astrocitos no altera la expresión de Nestina ni GFAP, pero retrasa la expresión de DCX, lo que sugiere un efecto antineurogénico. Sin embargo el medio POGa fomenta notablemente la expresión de DCX durante todo el experimento y el de GFAP al final del tiempo estudiado.

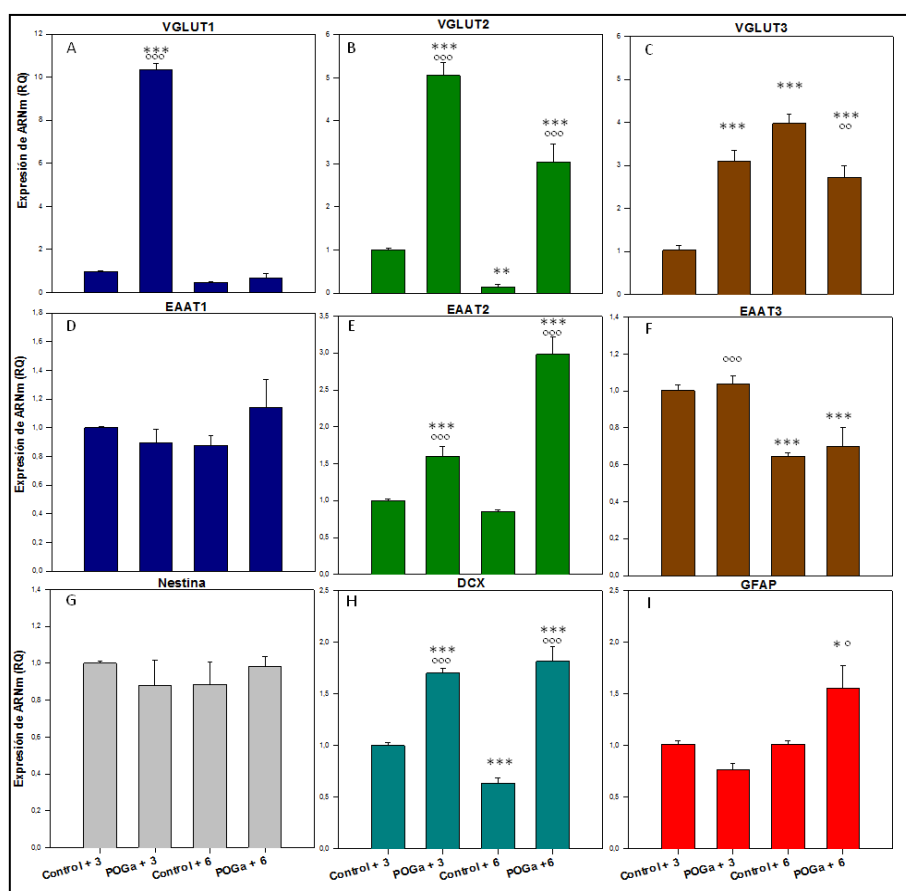


Figura 35: Efecto de la exposición de un cultivo de CPNs a medio condicionado por neuronas control o sometidas a POG (POGa). A-C) VGLUT1, 2 y 3. D-F) EAAT1, 2 y 3. G-I) Variables de neurogénesis. El medio control reprime la expresión de algunas VGLUT1 y 2, DCX y GFAP ya que no muestran el incremento característico de estos tiempos. El medio POGa induce la expresión de VGLUT1, 2 y 3, EAAT2, DCX y GFAP a diferentes tiempos. Los datos de expresión de ARNm (RQ) fueron comparados mediante ANOVA de una vía. n=2 experimentos analizados por triplicado. *P<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. ° Diferencia con el control de 3 días. °° Diferencia con el control de 6 días.

V. Análisis de resultados y discusión

V. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta tesis se ha abordado el estudio del efecto de la isquemia experimental transitoria sobre la expresión de los transportadores de glutamato VGLUTs y EAATs, con el objetivo final de determinar si es posible plantear la posibilidad de considerar a estos transportadores como diana terapéutica alternativa a las tradicionalmente abordadas en la isquemia. Nuestros resultados muestran la existencia de diversas alteraciones en la expresión de estos transportadores que les podrían involucrar, a través de la regulación de los niveles extracelulares de glutamato, en el proceso de neurogénesis que se potencia tras un ictus isquémico. A continuación, realizaremos el análisis de los resultados obtenidos en base a los cuales intentaremos dar respuesta a esta posibilidad.

1. Alteración en la expresión de transportadores de glutamato en la isquemia cerebral

1.1 La isquemia cerebral *in vivo* altera la expresión de VGLUTs.

En contraposición al trabajo de Kim y cols (2006), quienes indicaron que los VGLUTs disminuían en el hipocampo después de la isquemia global en gerbo, los resultados de esta tesis demuestran que la isquemia transitoria de la ACM, además de inducir alteraciones muy notables en la expresión de los transportadores de membrana plasmática de glutamato, EAATs, también inducen alteraciones muy notables en los niveles de expresión de los diferentes VGLUTs. La expresión de VGLUT1 se incrementa, tanto en corteza como en el caudado-putamen, en los primeros estadios de reperusión tras la isquemia y progresivamente va disminuyendo hasta alcanzar niveles de expresión incluso menores a los del hemisferio control, a nivel de proteína. Por el contrario, VGLUT2 y 3 muestran fundamentalmente una tendencia a disminuir durante el período de 7 días de reperusión estudiado en ambas estructuras (Figuras 4-8).

VGLUT2 se sintetiza principalmente en el tálamo y llega a la corteza y al caudado-putamen a través de proyecciones tálamo-corticales o tálamo-estriales (Moechars, 2006; Kashani et al., 2007). La disminución de la señal de VGLUT2 en estas estructuras podría ser fácilmente explicada como consecuencia de la degradación retrógrada de dichas proyecciones como producto del infarto cerebral (Wang et al., 2007) o por una reducción de la pequeña síntesis local que existe en estas estructuras (El Mestikawy et al., 2011). La degradación retrógrada se puede producir como consecuencia de la sección drástica de algunos axones producida a consecuencia de un trauma, como ocurre en el caso de la sección de la médula espinal, o en este caso a consecuencia de la isquemia (Wang et al., 2007).

Por último, la disminución en la expresión de VGLUT3 se caracteriza por desaparición tanto de dendritas como de somas marcados con esta proteína en corteza y caudado-putamen.

Para comprobar si las alteraciones observadas en la expresión de estos transportadores a nivel de proteína se debían a cambios en la expresión génica, se analizó su expresión a nivel de ARNm, mediante RT-qPCR. Los resultados indicaron que el incremento observado en la expresión de VGLUT1 a nivel de proteína en la

corteza no es acompañado por un incremento en el nivel de expresión del ARNm, ya que observamos una reducción generalizada de la expresión del ARNm de VGLUT1 en el hemisferio isquémico en comparación con la obtenida en el hemisferio control a lo largo del curso temporal. Por otra parte la expresión del ARNm de VGLUT2 se redujo significativamente a entre 6h y 3 días de reperusión y la del ARNm de VGLUT3 a 1 y 3 días de reperusión. En el caso del caudado-putamen, estos efectos inhibitorios fueron mucho más acusados que en el caso de la corteza, sobre todo con respecto a los niveles de expresión del ARNm de VGLUT1 y 3, no observándose una tendencia clara para VGLUT2 (Figura 12).

Mientras que en el caso de VGLUT2 y VGLUT3 la inhibición de la expresión de ARNm muestra un paralelismo con la reducción de la expresión a nivel de proteína en ambas estructuras, lo que indica que la inhibición de sus niveles a nivel de proteína pueden provenir de una inhibición a nivel transcripcional, no parece ser así en el caso de VGLUT1. Sin embargo, hay que considerar que este transportador se sintetiza principalmente en la corteza, y no en el caudado putamen, por lo que es lógico que disminuya más su expresión en el caudado putamen que en la corteza. Por ello, y teniendo en cuenta las diferencias observadas para la expresión del transportador entre ambas estructuras, podemos interpretar que en la corteza existe una tendencia a preservar la función del transportador. Otras posibles razones para explicar la discrepancia entre los resultados obtenidos para la expresión de VGLUT1 a nivel de ARNm y de proteína inducidas por la lesión isquémica podrían ser: 1) Que los cambios en la expresión del ARNm de VGLUT1 se hayan producido en tiempos diferentes a los estudiados y no se hayan podido detectar en nuestro estudio y 2) Que se activen otros mecanismos de regulación de este transportador a nivel post-traducciona que sean los responsables de mantener elevada la cantidad de proteína, tanto en la corteza como en el caudado putamen, en las primeras etapas de la reperusión. En apoyo a esta hipótesis hemos encontrado mediante microscopía electrónica la presencia de VGLUT1 no sólo en vesículas sinápticas de la zona de lesión, sino también en el aparato de Golgi (Figura 14).

1.1.1 Significado funcional de la acumulación de proteína de VGLUT1

Los resultados anteriores nos llevaron a preguntarnos si el incremento observado en la expresión de VGLUT1 en corteza y caudado putamen podría tener consecuencias deletéreas en el ámbito de la isquemia cerebral.

Experimentos *in vitro* de Wilson et al. (2005) demostraron que la liberación de glutamato es proporcional a la cantidad de VGLUT1 presente en las vesículas sinápticas, y que este proceso no está limitado por la concentración intracelular de glutamato o de ATP. Además, se ha demostrado que durante la recuperación de un período isquémico, el caudado-putamen experimenta un incremento de potenciales excitatorios post-sinápticos en miniatura (mEPSC) (Centonze et al., 2007). Daniels et al. (2011) han indicado que la sobreexpresión del transportador homólogo de VGLUT1 en *Drosophila*, DVGLUT1, puede causar muerte neuronal excitotóxica en neuronas postsinápticas y un aumento en la amplitud de mEPSC espontáneos. Paralelamente, estos investigadores encontraron un aumento en la mortalidad y dificultades motrices en las moscas. Por lo tanto, podría especularse que el incremento en los niveles de

VGLUT1 observados en corteza y caudado putamen inducirían un incremento en la liberación de glutamato que explicaría el aumento en los mEPSC observados en el caudado putamen observado por otros autores (Wilson et al., 2005; Centonze et al., 2007). Nuestros resultados muestran que no existe una correlación positiva entre la expresión de ARNm de los VGLUTs y el daño neurológico, pero si existe una correlación positiva con la acumulación de proteína de VGLUT1. Además, la eliminación forzada de glutamato hacia el plasma mediante el uso de oxalacetato durante etapas tempranas de reperfusión reduce el volumen de infarto de forma constante a lo largo de 7 días de reperfusión (Campos et al., 2011a). Todas estas evidencias en conjunto sugieren que la acumulación de VGLUT1 en las fases iniciales de la reperfusión conllevaría a un aumento en la liberación de glutamato que efectivamente podría contribuir a la excitotoxicidad.

En etapas prolongadas de reperfusión, en períodos superiores a 15 o 30 días, la actividad cortical es necesaria para que los pacientes que han sufrido un infarto cerebral recuperen la movilidad de las extremidades afectadas, por lo que un nivel elevado de VGLUT1 podría garantizar la recuperación de la funcionalidad del tejido lesionado ya sea por reestructuración de la red neuronal superviviente a la lesión, por ejemplo mediante la inducción de i-LTP, o promoviendo la integración de neuronas nuevas provenientes de la SVZ (Rossini et al., 2003; Di Filippo et al., 2008; Li et al., 2008; Murata et al., 2008).

Por lo tanto, es posible que VGLUT1 pueda tener un papel dual. Durante los primeros días de recuperación de un ictus, la acumulación de VGLUT1 y el consecuente incremento en la excitabilidad del tejido podría ser contraproducente al mantener un alto nivel de actividad sináptica en condiciones en las que el tejido no está preparado para responder adecuadamente. Pero posteriormente, una vez ha avanzado el proceso de neurogénesis y se ha reducido la reacción inflamatoria, la recuperación funcional de la penumbra podría requerir niveles elevados de VGLUT1 que garanticen este proceso. En este sentido el uso de ratones hemicigotos VGLUT1 +/- será fundamental para comprender mejor el papel de VGLUT1 en el daño agudo de la corteza y caudado putamen al inicio de la reperfusión, estudio que actualmente nos disponemos a iniciar.

1.2 La isquemia cerebral altera la expresión de EAATs.

Los transportadores de glutamato de membrana plasmática, EAATs, han sido ampliamente estudiados en diferentes modelos de isquemia y muestran diferentes respuestas dependiendo de si se aplica un modelo de preconditionamiento isquémico o de isquemia prolongada (Gottlieb et al., 2000; Rao et al., 2001a; Cimarosti et al., 2005; Pradillo et al., 2006). De acuerdo con la literatura, nosotros hemos encontrado una tendencia a la disminución de la expresión de EAAT2 a nivel de proteína en corteza y caudado putamen que podría ser secundaria a la muerte neuronal (Rao et al., 2001a), salvo por un incremento transitorio a 24h de reperfusión en esta última estructura. La expresión de EAAT1 muestra en ambas estructuras una tendencia a la disminución, contraria a la inalterabilidad descrita por otros grupos (Rao et al., 2001a). Por último, EAAT3 se redujo significativamente en la corteza pero no en el caudado-putamen (Figura 9). En cuanto a la expresión a nivel de ARNm, los tres EAATs mostraron una tendencia generalizada a la reducción, que fueron estadísticamente significativos a

diferentes tiempos de reperusión. Es notable que EAAT3 muestre un descenso estadísticamente significativo desde el inicio del período de reperusión tanto en corteza como en caudado putamen puesto que EAAT1 y 2 se mantienen en niveles próximos al control a 6h de reperusión, lo que sugiere que la expresión de EAAT3 a nivel de ARNm es más vulnerable que la de los otros dos transportadores, concentrando toda la capacidad de recaptación de glutamato en EAAT1 y 2 (Figura 13).

1.2.1 Significado funcional de la reducción de la expresión de EAATs

Los primeros trabajos que abordaron el estudio del transporte de glutamato en la isquemia cerebral indicaron que en el momento concreto de la misma el desequilibrio de electrolitos existente a través de la membrana plasmática podía causar un incremento en el transporte reverso de glutamato a través de los EAATs (Rossi et al., 2000). Sin embargo, el trabajo posterior de Rao et al (2001b), demostró que la eliminación de EAAT2 mediante oligonucleótidos antisentido en realidad empeoraba la patología durante la reperusión. Estos resultados indican, por tanto, que la expresión de EAAT2, lejos de ser causante del daño neuronal, en realidad ayuda a limitar el daño tisular durante la reperusión evitando la formación de edema astrocítico, probablemente mediante la eliminación masiva de glutamato hacia el plasma sanguíneo a través de las células endoteliales (Rao et al., 2001b; Campos et al., 2011a). Por otro lado se ha observado que el preconditionamiento isquémico, proceso que fortalece al tejido nervioso ante posibles daños futuros, puede promover un incremento transitorio de EAAT1 en el hipocampo (Kim et al., 2006) o un descenso no significativo en la corteza (Pradillo et al., 2006).

La disminución de la expresión de EAATs que hemos encontrado, particularmente la de EAAT1 y 2, podría, por lo tanto, tener consecuencias negativas para la recuperación del tejido cerebral. Puesto que, según indican nuestros datos, en este período la acumulación de VGLUT1 podría generar una mayor liberación de glutamato en la penumbra, sería necesario mantener elevada la expresión de EAATs para que el exceso de glutamato pudiera ser retirado hacia la glia reactiva o expulsado del SNC a través de las células endoteliales.

Correlación de la expresión de VGLUT1 y EAAT2 en el caudado-putamen.

Nuestros resultados indican la existencia de una correlación positiva entre la expresión de VGLUT1 y EAAT2 en el caudado putamen a nivel de proteína. Así mismo, hemos observado que los niveles de ARNm de VGLUT1 descienden lentamente a lo largo del curso temporal en corteza, hecho que parece coincidir con la curva de decrecimiento de la expresión de EAAT1 y 2. Estos datos sugieren la posibilidad de una regulación conjunta de ambos sistemas de transporte con implicaciones funcionales. Por lo tanto, podemos plantear un modelo en el que la isquemia cause un incremento de VGLUT1 y EAAT2, en donde el aumento de VGLUT1 podría ser responsable de un incremento en la liberación de glutamato que podría relacionarse con la aparición de i-LTP o con un incremento de la mortalidad neuronal, y en el que EAAT2 eliminaría el exceso de glutamato del espacio sináptico estriatal (Figuras 10 y 11).

La pregunta importante, por tanto, es conocer por qué esta correlación la hemos encontrado delimitada al caudado putamen. ¿Qué diferencias existen en los mecanismos de reparación tisular entre la corteza y el caudado putamen? La confirmación de la existencia de un mecanismo de correlación funcional entre ambos sistemas de transporte y el conocimiento del control de dicho proceso podría permitir contar con una nueva estrategia de neuroprotección y/o neurorreparación en el ictus isquémico.

1.4 Presencia de VGLUT2 y 3 en la glía reactiva del cuerpo calloso isquémico

Probablemente el resultado más interesante de este trabajo sea la detección de VGLUT2 y 3 en los astrocitos reactivos del cuerpo calloso del hemisferio isquémico (Figuras 15-18). Estos dos transportadores siempre se han asociado a neuronas, no sólo glutamatérgicas sino también serotoninérgicas y colinérgicas (Fujiyama et al., 2001; Herzog et al., 2004; El Mestikawy et al., 2011), y se han descrito alteraciones en su patrón de expresión en la esquizofrenia y la enfermedad de Parkinson (Takamori, 2006; Kashani et al., 2007). La presencia de estos transportadores en astrocitos *in vitro* fue descrita por primera vez por Montana et al. (2004). Estos autores demostraron que a pesar de que sólo un tercio de los astrocitos del cultivo expresaban los VGLUTs, estas células respondían al aumento intracelular de Ca^{2+} liberando glutamato por exocitosis y que los VGLUTs tenían un papel funcional en dicho proceso. Posteriormente demostraron que de los tres transportadores, VGLUT3 es el más implicado en la liberación de glutamato y que el incremento en la concentración de glutamato en el citosol afecta directamente al almacenamiento y liberación vesicular de glutamato por los astrocitos (Ni and Parpura, 2009). *In vitro* la liberación de glutamato desde los astrocitos, a través de los VGLUTs, puede ser inducida mediante estimulación con SDF1 α (Cali et al., 2008). Si bien la K_m para el transporte de glutamato por VGLUT3 (0,56 mM) es más baja que las de VGLUT1 y 2 (3,4 y 1,9 mM, respectivamente), lo que explica su mayor capacidad de transporte (Ni and Parpura, 2009), es posible que la estimulación con SDF1 α desencadene mecanismos intracelulares que fomenten el transporte de glutamato a través de VGLUT1 y 2. Además, la expresión de SDF1 α se incrementa en glía reactiva y células endoteliales del cuerpo calloso isquémico y zonas próximas durante la recuperación de la isquemia al menos durante los primeros 15 días de perfusión (Li et al., 2008). Todas estas evidencias apoyan la posibilidad la expresión de VGLUT2 y 3 en la glía reactiva del cuerpo calloso isquémico pueda tener interesantes implicaciones funcionales con respecto a la función del glutamato liberado por estos transportadores durante la isquemia cerebral. Así, puesto que se ha demostrado que durante la perfusión post-isquémica aumentan los niveles de SDF1- α en el CCi (Li et al., 2008), es factible plantear la hipótesis de que los astrocitos reactivos de CCi estarían liberando glutamato a través de VGLUT2 y 3 en respuesta a la estimulación de SDF1- α . En apoyo a nuestra hipótesis, trabajos de Arranz et al. (2009), desarrollados en paralelo a nuestro trabajo, han mostrado que tras una isquemia transitoria los transportadores de glutamato EAAT1 y 2 son sobre-expresados por células gliales en el cuerpo calloso isquémico durante los primeros 7 días de perfusión. Ambos resultados, en conjunto, sugieren que en el CCi se está dando un proceso de liberación y recaptación localizado de glutamato en respuesta a las citoquinas liberadas localmente como consecuencia de la isquemia.

En la búsqueda de una posible función para el glutamato liberado por los astrocitos del CCI, es interesante destacar que evidencias recientes de varios grupos de investigación han demostrado que la generación de daños traumáticos al cerebro o de infartos cerebrales es capaz de promover la proliferación de células madre de la zona subventricular (SVZ) y su migración hacia la corteza alterada (Hossmann, 2006; Agasse F, 2007; Zhang et al., 2008), siendo dependiente dicho proceso de factores como SDF1- α o el balance entre GABA y glutamato a lo largo del cuerpo calloso (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; Platel et al., 2007). Por otra parte se ha observado que la estimulación de la liberación de glutamato en la corteza isquémica promueve la formación de nuevas neuronas a partir de la diferenciación de neuroblastos de la SVZ (Li et al., 2008), a pesar de que el número de neuroblastos que sobreviven a todo el proceso sólo representa un pequeño porcentaje del total de células producidas en la SVZ.

Dado que Platel et al. (2010a) han demostrado recientemente que la activación de los receptores NMDA es fundamental para la supervivencia de neuroblastos en la RMS, y que existen evidencias sustanciales de que el glutamato puede modular la proliferación y migración de neuroblastos hacia la zona lesionada (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; Castiglione et al., 2008; Li et al., 2008), formulamos la hipótesis de que los transportadores VGLUT2 y 3 estarían implicados de alguna manera en la neurogénesis, contribuyendo a este proceso mediante la liberación local de glutamato.

2. Implicación de las alteraciones de la expresión de VGLUTs y EAATs en el proceso de neurogénesis de la SVZ

2.1 Caracterización de la expresión de VGLUTs y EAATs en CPNs

Para intentar demostrar esta hipótesis hemos utilizado un modelo de cultivo de CPNs que ha sido validado previamente (Agasse et al., 2004). Nuestro estudio de expresión de ambos tipos de transportadores de glutamato, tanto a nivel de ARNm (RT-qPCR) como de proteína (western blot e inmunocitoquímica) indican que los transportadores pueden ser sintetizados por *in vitro* (Figuras 21, 23 y 25-30). Nuestros resultados de expresión, a nivel de ARNm, de diversas proteínas implicadas en proliferación (Nestina, SOX2, TLX) diferenciación (DCX, NCAM, B3T, GFAP) (Figura 22) junto al estudio de expresión de VGLUTs y EAATs parecen demostrar la existencia de una posible correlación entre los niveles de expresión de estas proteínas con los de los transportadores de glutamato. Ciertamente, durante los primeros 15 días de diferenciación del cultivo, DCX, GFAP y otras variables de neurodiferenciación muestran una curva ascendente que es semejante a la curva de aumento de expresión de los VGLUTs y a la de EAAT2, pero no EAAT1 y 3 (Figuras 21 y 22). La expresión a nivel de ARNm de EAAT1 no muestra apenas variación a lo largo del curso temporal estudiado, la de EAAT3 presenta un pico de expresión a los 5 días de diferenciación y una reducción posterior, mientras que la de EAAT2 sí sigue una curva paralela a la de DCX y GFAP (Figuras 21 y 22). Los resultados de la expresión de VGLUTs a nivel de proteína mediante western blot también mostraron una tendencia ascendente en la expresión de los transportadores, paralela a la de ARNm, pero menos pronunciada (Figura 23). Así, si bien el nivel de expresión de ARNm de los VGLUTs aumentó hasta

entre 10 y 20 veces dependiendo del transportador, los niveles de proteína no llegan a superar 2 veces el valor del control.

Como se ha indicado, los cultivos de CPNs producen al menos dos tipos de células mayoritarias, astrocitos y neuroblastos, o neuronas en cultivos que lleven varios días de diferenciación. Para determinar qué tipo de células expresaban los VGLUTs realizamos inmunodetecciones en las que correlacionamos la expresión de los VGLUTs con los marcadores DCX y GFAP. El resultado más llamativo de estos experimentos fue encontrar que los VGLUTs se expresan por la mayoría de las células del cultivo (Figura 24), lo que sugiere un papel muy importante para el glutamato en el cultivo. Como hemos indicado previamente, otros investigadores han demostrado que la liberación de glutamato en la RMS es fundamental para la supervivencia de los neuroblastos que se dirigen al bulbo olfatorio (Platel et al., 2007; 2010a). El análisis de coexpresión de VGLUTs y DCX o GFAP (Figuras 25-30) indicó que ambos tipos de células pueden expresar los transportadores pero que el patrón de expresión varía con el tiempo. Así pues, a los 3 días de diferenciación un 30% de las células son células gliales que expresan VGLUT1, 2 y 3, pero este porcentaje se reduce significativamente hacia los 7 días de diferenciación para VGLUT1 y 2 y no para VGLUT3, lo que sugiere que a medida que las células gliales se hacen más maduras tienden a mantener la expresión de VGLUT3 (Figuras 28-30). Por otro lado, a 3 días de diferenciación un 30% de las células son neuroblastos que expresan los VGLUTs, pero a diferencia de los astrocitos, observamos una tendencia ascendente en la expresión de VGLUT1 y 3 en neuroblastos a pesar de no haber encontrado una diferencia significativa, quizás debido al breve tiempo de diferenciación utilizado en esta serie de experimentos (3 y 7 días) (Figuras 25-27). Estos resultados fueron confirmados por un análisis informático de correlación de la señal de VGLUTs y los marcadores DCX o GFAP (Figura 32).

2.2 El glutamato puede inducir la expresión de VGLUTs y reprimir la de EAATs a través del receptor mGluR5

Como hemos dicho el glutamato regula la neurogénesis en la RMS y en condiciones patológicas modula el desplazamiento de los neuroblastos hacia la zona lesionada (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; Platel et al., 2010a). Para determinar si estos efectos podrían estar relacionados con la alteración de la expresión de sus sistemas de transporte, estimulamos a las neuroesferas en diferenciación con DHPG 1, 10 y 100 μ M y glutamato 2mM durante 24h y posteriormente las células continuaron la diferenciación en un medio libre del estímulo. Los resultados de estos experimentos indicaron que tanto DHPG como glutamato 2 mM pueden promover la expresión de los VGLUTs y reprimir parcialmente la expresión de los EAATs (Figura 33). Notablemente, la sobreexpresión de VGLUTs fue acompañada de un incremento en la expresión de DCX y GFAP. En consecuencia, podemos concluir que el proceso de diferenciación inducido por glutamato es paralelo al incremento en la expresión de los VGLUTs.

Este experimento arroja dos consideraciones muy interesantes:

1) En primer lugar que el glutamato parece regular la expresión de los VGLUTs por diferentes mecanismos. A medida que aumenta la dosis de DHPG, VGLUT1 se mantiene elevado, VGLUT2 se comienza a expresar y VGLUT3 se reprime. Esto indica que muy probablemente aunque algunas de las vías de señalización implicadas en la inducción de la expresión de VGLUT1, 2 y 3 puedan ser comunes, también deben existir mecanismos de represión de su expresión que pueden ser diferentes para cada uno de estos transportadores. Esta conclusión se pone en evidencia claramente en el efecto inductor de la expresión de VGLUT 1 y 3 producido por glutamato 2 mM, frente a la ausencia de inducción de la expresión de VGLUT2 (Figura 31). Este efecto concuerda con nuestros resultados de inmunocitoquímica mostrando la localización preferente de VGLUT1 y 3 frente a VGLUT2 en neuroblastos (Figuras 24-26). Por otro lado, el hecho de que VGLUT2 se induzca por DHPG 100 μ M pero no por glutamato 2 mM, que de hecho es una concentración considerada como excitotóxica, hace pensar o bien en que la expresión de VGLUT2 esté regulado principalmente por mecanismos que no impliquen al glutamato o bien que haya otros receptores glutamatérgicos que controlen negativamente su expresión. Así pues, la complejidad de la regulación por glutamato y sus agonistas tanto de receptores metabotrópicos como ionotrópicos, requiere la realización de un estudio más detallado que está planificado realizar.

2) En segundo lugar, la sobreexpresión de los VGLUTs debería ir acompañada de un incremento de la expresión de EAATs, hecho que no hemos confirmado en nuestro estudio. Este efecto parece contradictorio dado que, en base a los trabajos citados (Arranz et al., 2009; Sanchez-Mendoza et al., 2010), deberíamos observar incremento en paralelo de ambos sistemas de transporte. A pesar de que estos datos sólo están valorados a nivel de ARNm, el resultado de la caracterización por western blot de expresión de VGLUTs en condiciones basales puede darnos una orientación a este respecto. Como dijimos, en un plazo de 10-15 días la expresión del mensajero de VGLUTs puede aumentar entre 10 y 40 veces dependiendo del transportador, sin embargo la cantidad de proteína sólo se incrementa 1,5 veces respecto a un nivel de basal a 3 días de diferenciación. Según estos resultados, se podría deducir que puesto que el incremento en la expresión de VGLUTs a los 3 días, utilizados en este estudio, es pequeño, la cantidad de glutamato liberado en este tiempo será lo suficientemente baja como para no ser excitotóxica, pero lo suficientemente alta para favorecer el proceso de diferenciación. En consecuencia, la reducción de la expresión de los EAATs observada podría contribuir a este efecto proneurogénico del glutamato al favorecer un cierto incremento de sus concentraciones extracelulares.

2.3 La isquemia *in vitro* altera el patrón de expresión de VGLUTs en las CPNs

Una vez caracterizada la expresión de los VGLUTs en el cultivo de CPNs, quisimos determinar si el proceso isquémico podía alterar la expresión de los VGLUTs en estas células. Dado que las células gliales reactivas del CCI están a gran distancia de la SVZ pensamos que su influencia sobre los neuroblastos debía ocurrir a través de factores difusibles (Agasse et al., 2004; Qin Shen et al., 2004; Agasse et al., 2007; Agasse F, 2007; Agasse et al., 2008; Jennifer M. Plane et al., 2010). Por ello recurrimos a la exposición de las CPNs, durante el inicio de la diferenciación, a medios condicionados

procedentes de neuronas o astrocitos sometidos a privación de oxígeno y glucosa (POG) durante 4 horas y a un periodo de reperfusión de 12h.

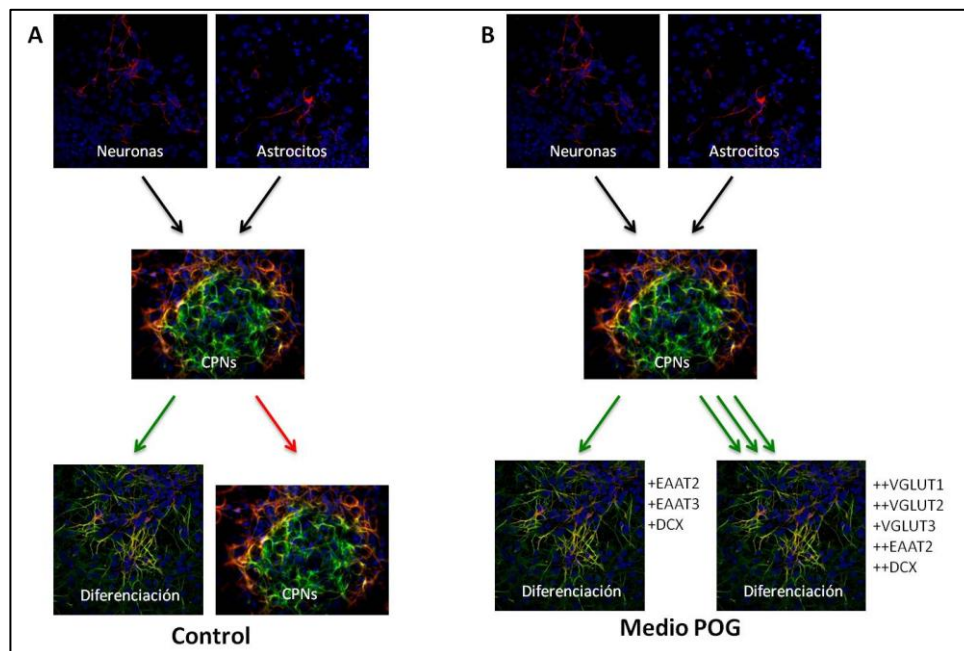


Figura 36: Modelo de la respuesta de las CPNs a la exposición a medios condicionados por neuronas o astrocitos control o sometidos a privación de oxígeno y glucosa (POGn o POGa). A) La exposición al medio de neuronas control no afecta la diferenciación mientras que la exposición al medio de asotrcitos control inhibe este proceso. B) La exposición al medio POGn aumenta levemente la diferenciación de neuroblastos acompañado de un leve incremento de EAAT2 y 3. La exposición al medio POGa promueve la expresión de VGLUTs, EAAT2 en paralelo con la neurodiferenciación. Esto indica que los astrocitos reactivos liberan sustancias difusibles que pueden promover la activación de un sistema de liberación y recaptación de glutamato en paralelo a la neurodiferenciación de CPNs.

Mediante este procedimiento de isquemia experimental obtuvimos resultados muy interesantes (Figuras 34 y 35). Por un lado, el medio condicionado procedente de neuronas control no alteró el patrón de expresión de VGLUTs, EAATs, DCX o GFAP, mientras que el medio procedente de astrocitos control retrasó el incremento en la expresión de estas proteínas marcadoras de neurogénesis (Figuras 34 y 35). Dicho retraso fue acompañado de una reducción de la expresión de VGLUTs. Agasse et al.(2004), mostraron que sustancias liberadas al medio desde explantes corticales podían retrasar la diferenciación celular. En un cultivo de estas características se mantienen las relaciones estructurales entre células gliales, neuronas y endotelio, lo que convierte a esta técnica en una poderosa estrategia para comprender la respuesta de las CPNs a la presencia de un tejido lesionado, pero no aclara qué grupo celular influencia su desarrollo. El hecho de que, en nuestro caso, el medio condicionado procedente de astrocitos control haya retrasado la diferenciación sugiere que el bloqueo de la diferenciación observado por Agasse et al. (2004) podría deberse a la acción de células gliales no reactivas presentes en el explante cortical.

Los medios condicionados obtenidos a partir de neuronas o astrocitos sometidos a isquemia *in vitro* (POGn, POGa) tuvieron efectos diferentes sobre la expresión de VGLUTs, EAATs y marcadores de diferenciación. El medio POGn sólo indujo un ligero incremento en la expresión de EAAT2 y 3 y no de los VGLUTs. Por otro lado, la expresión de Nestina no se alteró, pero sí aumentaron la expresión de DCX y GFAP, resultado que interpretamos como un incremento en la diferenciación de las CPNs (Figura 34). Sin embargo, el medio POGa incrementó de forma muy significativa la expresión de VGLUT1 y 2. VGLUT3 aumentó significativamente a 3 días de diferenciación, aunque no llegó a superar el nivel de expresión del control de 6 días. Además, el medio POGa incrementó la expresión de EAAT2 a 3 y 6 días, pero no tuvo efecto apreciable sobre la de EAAT1 y 3 (Figura 35).

Dado que no hubo contacto físico entre las neuronas y astrocitos sometidos a POG con las CPNs, los resultados indican que tanto las neuronas como los astrocitos están liberando factores que modulan la expresión de los VGLUTs y EAATs en las CPNs. Además dichos factores influyen en el nivel de diferenciación de las CPNs, ya que incrementaron la expresión de DCX y GFAP.

Al igual que en el caso de la estimulación con DHPG, observamos un aumento de la diferenciación en paralelo con el incremento en la expresión de VGLUTs y en este caso también acompañado de un incremento de la expresión de EAAT2, tal como cabía esperar a partir de nuestro trabajo y el de otros autores (Arranz et al., 2009; Sanchez-Mendoza et al., 2010). La razón por la que en condiciones de isquemia *in vitro* sí encontramos un incremento paralelo de ambos sistemas de transporte podría ser que el medio POGa contendrá diferentes factores que pueden liberarse desde los astrocitos reactivos, por ejemplo BDNF, SDF1- α , VEGF, glutamato y TNF- α entre otros. SDF1- α puede además promover la liberación de glutamato desde los astrocitos mediante un proceso exocitótico por la activación del receptor CXCR4 (Cali et al., 2008). Por tanto, presumiblemente el medio POGa estará cargado con factores tróficos y altos niveles de glutamato que tendrían un efecto conjunto muy superior a la estimulación por glutamato o DHPG en la diferenciación y expresión de VGLUTs. De la misma manera, si la sobreexpresión de VGLUTs es mucho mayor en este caso, presumiblemente habrá un incremento en la liberación endógena de glutamato mucho más importante. En consecuencia, la sobreexpresión de EAAT2 podría mantener controlados los niveles de glutamato extracelular a concentraciones favorables a la neurodiferenciación. La Figura 36 presenta un resumen del resultado de estos experimentos.

2.3.1 ¿En qué tipo celular aumenta la expresión de VGLUTs por los estímulos estudiados?

Nuestra cuantificación de células (Figuras 25-30) y análisis de coexpresión informático (Figura 32) indicaban que a medida que avanza el proceso de diferenciación de las CPNs, cambia su patrón de expresión de VGLUTs. Así, observamos que las células gliales más maduras expresan menos VGLUT1 y 2, aunque mantienen la expresión de VGLUT3. Por el contrario, la proporción de neuroblastos que expresa VGLUT1 y 3 a 7 días de diferenciación tiende a aumentar. En consecuencia, el incremento observado en la expresión de VGLUT1 y 3 tras la exposición de CPNs al medio POGa posiblemente estará ocurriendo en los

neuroblastos. No obstante, será necesario realizar experimentos que permitan determinar con precisión si la expresión de los VGLUTs y, por ende, la liberación de glutamato desde los neuroblastos, favorece su migración o supervivencia *in vitro* y caracterizar este efecto *in vivo* a largo plazo.

2.3.2 ¿Sería posible que los VGLUTs constituyan una diana terapéutica en el tratamiento de la isquemia?

Nuestros resultados indican que posiblemente sí. La isquemia *in vivo* puede inducir la expresión de VGLUT1 en la corteza y caudado putamen, y de VGLUT2 y 3 en el CCI. Además, la experimentación *in vitro* sugiere que los astrocitos reactivos pueden inducir la expresión de VGLUT1, 2 y 3 en neuroblastos *in vitro*. Existe la posibilidad de que la acumulación de VGLUT1 en la corteza y en el caudado putamen aumenten la liberación de glutamato en las áreas afectadas de estas estructuras (Centonze et al., 2007). Sin embargo, las evidencias obtenidas por otros investigadores revelan un panorama ambiguo. Por una parte, evidencias de Daniels et al. (2011) indican que la sobreexpresión de VGLUT1 podría fomentar la excitotoxicidad pero, por otra, trabajos de diversos autores indican que el incremento en la liberación de glutamato podría ser beneficiosa para la recuperación del tejido afectado a largo plazo (Di Filippo et al., 2008; Li et al., 2008). Además, la asociación observada entre la expresión de VGLUTs, DCX y GFAP *in vitro* sugiere la existencia de algún proceso que vincule la expresión de VGLUTs con la diferenciación o la supervivencia de las CPNs. Así pues, la liberación de glutamato a través de VGLUT2 y 3 en los astrocitos del CCI podría favorecer la supervivencia de los neuroblastos de un modo similar al encontrado por Platel et al. (2010a) en la RMS a través de los receptores NMDA, o a través de los receptores metabotrópicos (Castiglione et al., 2008), o ser un efecto más indirecto relacionado con un aumento en la liberación de factores neurogénicos como BDNF, VEGF o SDF1 α en el nicho neurovascular del área infartada (Jean et al., 2008). Por lo tanto, es necesario profundizar en el conocimiento del papel funcional de VGLUT1 en la corteza y caudado putamen para comprender mejor su contribución al daño isquémico, y en el de los 3 VGLUTs en la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de las CPNs tanto *in vivo* como *in vitro*. Dicho conocimiento nos permitirá elaborar aproximaciones terapéuticas basadas en la modulación de la liberación de glutamato para proteger y regenerar la zona lesionada por el ictus isquémico.

2.3.3 Propuesta de un modelo de participación de los VGLUTs en la neurogénesis de la SVZ tras la isquemia.

Basándonos en lo dicho en el apartado anterior, hemos querido resumir esta serie de ideas en un modelo secuencial hipotético que indique cuál podría ser el rol de los VGLUTs en la neurogénesis post-isquemia (Figura 37).

A) En condiciones normales, los astrocitos del tejido sano impedirían la migración de los neuroblastos fuera de la RMS (Figura 37 A). **B)** Tras la aparición de la lesión isquémica la glía reactiva del CCI expresaría factores tróficos como SDF1- α , que podría promover la liberación exocitótica de glutamato de vesículas cargadas con VGLUT2 o 3 (Cali et al., 2008). Este glutamato podría a su vez promover la liberación de BDNF desde los mismos astrocitos (Jean et al., 2008). SDF1- α y BDNF, así como VEGF, que sería liberado desde las células endoteliales, ejercerían un efecto inductor

de proliferación y quimiotáctico sobre las CPNs de la SVZ. Durante la migración e inicio de la diferenciación de las CPNs, los altos niveles de glutamato del CCI podrían promover la supervivencia de los neuroblastos a través de los receptores NMDA o mGluR5 (Di Giorgi-Gerevini et al., 2005; Platel et al., 2010a), mientras se acercan al entorno inflamatorio presente en la penumbra. Los niveles de glutamato en el CCI se mantendrían en un nivel adecuado para promover la supervivencia de los neuroblastos mediante la sobreexpresión de los transportadores EAATs (Arranz et al., 2009). Por último, a la llegada de los neuroblastos a la zona de penumbra isquémica, el incremento en la expresión de VGLUT1 cortical o estriatal, mantendría también un alto nivel de glutamato que podría fomentar la terminación del proceso de diferenciación de neuroblastos en neuronas y su integración sináptica con la red neuronal preexistente (Figura 37 B).

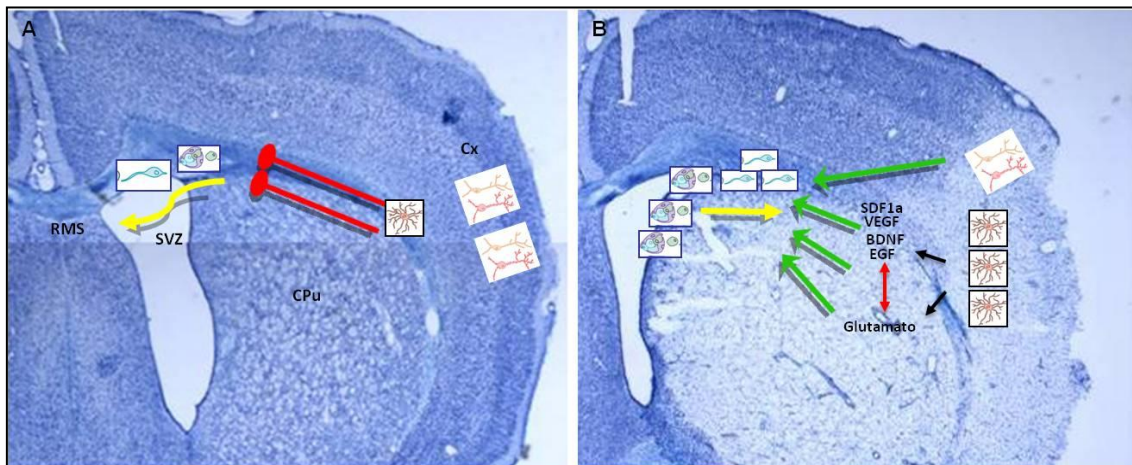


Figura 37: Modelo propuesto para el efecto de la isquemia focal transitoria sobre la diferenciación de CPNs de la SVZ y para el posible papel funcional de VGLUTs en este proceso. A) En condiciones normales los astrocitos del tejido sano impedirían el desplazamiento de neuroblastos hacia el estriado (CPu) o corteza (Cx). En consecuencia, los neuroblastos se desplazarían a lo largo de la RMS al bulbo olfatorio atraídos por factores tróficos locales. B) Tras un episodio de isquemia focal transitoria, las neuronas lesionadas y astrocitos reactivos ejercerían un efecto quimiotáctico (flechas verdes) sobre los neuroblastos de la SVZ que se desplazarán a las estructuras lesionadas (flecha amarilla). Este efecto puede estar mediado por la liberación desde los astrocitos reactivos de glutamato, a través de los VGLUTs, o factores tróficos como SDF1 α , VEGF, BDNF o EGF (flechas negras). Tanto el glutamato como los factores tróficos podrían potenciar mutuamente su liberación desde astrocitos o células endoteliales (no mostradas. Flecha roja). El glutamato promovería la supervivencia de neuroblastos a través de los receptores mGluR5 o NMDA.

Para validar la importancia de los VGLUTs en la isquemia y reperusión *in vivo* y en el proceso de neurogénesis *in vivo* e *in vitro* proponemos una serie de

aproximaciones experimentales que nos permitirán ratificar o descartar el modelo propuesto:

1. Aproximaciones *in vivo*:

- a. Caracterización del proceso de acumulación o degradación de VGLUT1 en la corteza y caudado putamen en condiciones de isquemia y reperfusión. Por ejemplo sería de gran utilidad determinar si el complejo del proteasoma participa en la degradación de esta proteína durante la reperfusión.
- b. Inhibición de la actividad de VGLUT1 mediante siRNA en un modelo de tMCAO en ratas y evaluación del deterioro neurológico mediante pruebas de conducta y resonancia magnética funcional.
- c. Estudio de efectos de la isquemia en ratones VGLUT1 +/- (Tordera et al., 2005) mediante valoración del deterioro neurológico y recuperación funcional del animal en ambientes control o enriquecidos (Komitova et al., 2006).
- d. Estudio electrofisiológico en rodajas coronales que mantengan la conectividad de corteza y caudado putamen, comparando diferencias en EPSPs inducidas por glutamato entre animales control y VGLUT1 +/- . También se podrían utilizar compuestos como el Evans Blue o Rosa de Bengala para inhibir la actividad de VGLUTs *in vitro*.
- e. Codetección de VGLUTs y BrdU o DCX en la SVZ y CCi mediante inmunohistoquímica en ratas.
- f. Estudio de la RMS en ratones VGLUT1 +/- o VGLUT2 +/-: migración de neuroblastos, supervivencia, organización del bulbo olfatorio, estudios de conducta.

2. Aproximaciones *in vitro*:

- a. Caracterización de los tipos celulares que expresan VGLUTs mediante citometría de flujo.
- b. Uso de siRNA para bloquear parcialmente la función de VGLUTs en condiciones basales y tras la isquemia *in vitro*.
- c. Desarrollo de un cultivo de CPNs en ratones VGLUT1 +/- o VGLUT2 +/- y caracterización del proceso de neurogénesis en éstas células.
- d. Respuesta a la isquemia: migración de neuroblastos, supervivencia de neuroblastos.
- e. Estudio del efecto de medios condicionados procedentes no sólo de neuronas y astrocitos, sino también de células endoteliales, sometidas a POG "in vitro" a menores y mayores tiempos de los estudiados o adaptación del experimento a método de cocultivo.
- f. Estudio de la supervivencia o proliferación (TUNEL, BrdU, XTT) de CPNs tratadas con los medios condicionados o en cocultivo.
- g. Efecto del siRNA de VGLUTs sobre la migración de CPNs después de tratamiento con los medios condicionados anteriores.
- h. Valoración de la funcionalidad de los VGLUTs en CPNs en cultivo mediante visualización de la fusión de vesículas VGLUT+ en la membrana como consecuencia de un estímulo que induzca un incremento de Ca^{2+} en las células por técnicas como TIRF (Cali et al.,

2008) o edición de liberación de glutamato en “tiempo real” o a punto final mediante espectrofluorimetría con GDH o HPLC.

VI. Conclusiones

VI. CONCLUSIONES:

A continuación resumimos las principales conclusiones a las que ha dado lugar este trabajo de investigación:

1. La isquemia focal transitoria por oclusión de la arteria cerebral media (tMCAO) en ratas altera de forma diferente el patrón de expresión de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT1-3) en la corteza cerebral, caudado putamen y cuerpo calloso. Así, la isquemia induce un incremento transitorio en la expresión de VGLUT1 a nivel de proteína en la corteza y caudado putamen isquémicos en etapas tempranas de diferenciación, que no se acompaña de un pico en la expresión de ARNm, a pesar de que la cantidad de proteína está claramente incrementada tanto en vesículas como en el aparato de Golgi de la corteza isquémica, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de regulación de este transportador a nivel post-traduccional. Por el contrario, la isquemia reduce la expresión de VGLUT2 y 3 en la corteza y caudado putamen isquémicos, tanto a nivel de proteína como de ARNm.

2. En paralelo, la tMCAO también altera el patrón de expresión de los transportadores de glutamato de membrana plasmática (EAAT1-3), reduciendo la expresión, tanto a nivel de proteína como de ARNm de EAAT1 y 3, e incrementando los niveles de expresión de EAAT2 en las primeras etapas de la reperusión a nivel de proteína, incremento que tampoco se acompaña de un pico previo en la expresión de ARNm de este transportador.

3. Existe una correlación positiva entre la expresión de VGLUT1 y el daño neurológico durante las primeras etapas de reperusión, por lo tanto VGLUT1 podría ser utilizado como marcador de la progresión del daño neurológico en este período.

4. Existe una correlación positiva entre la expresión de VGLUT1 y EAAT2 en el caudado putamen durante el inicio de la reperusión, lo que sugiere que ambos transportadores cooperan funcionalmente en la regulación de los niveles de glutamato en esta estructura.

5. VGLUT2 y 3 se expresan en la glia reactiva del cuerpo calloso isquémico durante la reperusión, como indican los datos de colocalización inmunohistoquímica de estos transportadores con GFAP y glutamina sintetasa. La liberación de glutamato de estas células podría estar vinculado al proceso de neurogénesis que se desencadena como consecuencia de la isquemia.

6. Las células precursoras neurales (CPNs) de la SVZ en cultivo primario expresan, a nivel de ARNm y proteína, los distintos transportadores de glutamato, VGLUT1-3 y EAAT1-3. Dicha expresión que se incrementa con el tiempo de diferenciación del cultivo, correspondiendo los mayores incrementos a la expresión de VGLUT2 y 3, en el caso de los transportadores vesiculares, y de EAAT2, en el caso de los de membrana plasmática. Paralelamente, durante este tiempo, se incrementa la expresión, a nivel de ARNm, de proteínas marcadoras de diferenciación y adhesión celular, como DCX y proteína de adhesión celular neural (NCAM), así como de proteínas marcadoras de fenotipo glial (GFAP) y neuronal (B3T); sin embargo a lo

largo del cultivo disminuye la expresión de la proteína marcadora de proliferación Nestina.

7. Los experimentos de inmunocitoquímica de dobles marcajes entre los diferentes transportadores de glutamato y DCX o GFAP, muestran que los tres VGLUTs pueden encontrarse en neuroblastos y astrocitos. VGLUT1 y 3 tienden a aumentar en neuroblastos a lo largo de la diferenciación mientras que VGLUT3 aumenta en astrocitos. VGLUT2 puede estar presente en ambos tipos celulares manteniéndose constante en neuroblastos y reduciéndose en astrocitos.

8. La activación del receptor mGluR5 por DHPG y el tratamiento de las CPNs con glutamato, promueve un incremento en la expresión de VGLUTs y de EAAT2, que es paralelo al proceso de diferenciación de neuroblastos y células gliales, lo que indica que el receptor metabotrópico mGluR5 es uno de los receptores de glutamato implicado en la neurogénesis de la SVZ, que pudiese estar activo tras la isquemia, aunque no se descarta la participación de otros receptores glutamatérgicos, así como de otros factores liberados por astrocitos, neuroblastos y células endoteliales en el efecto inductor de la neurogénesis de la SVZ por la isquemia experimental.

9. El tratamiento de las CPNs en cultivo primario con medios condicionados procedentes de neuronas y astrocitos sometidos a privación de oxígeno y glucosa (POG) tienen diferente efecto sobre la expresión de VGLUTs y EAATs. Así, mientras que el medio condicionado procedente de neuronas (POGn) sólo induce un ligero incremento en la expresión de EAAT2 y 3 y no de los VGLUTs, el tratamiento con el medio condicionado procedente de astrocitos isquémicos (POGa) incrementó muy significativamente la expresión de VGLUT1-3, de EAAT2. El incremento de expresión de transportadores vino acompañado de un incremento en la expresión de DCX y GFAP, lo que indica un incremento en la diferenciación. Esto sugiere que el incremento en la liberación de glutamato y la regulación de sus niveles extracelulares mediado por estos transportadores podría conducir a un incremento en la diferenciación de los precursores neurales en las etapas tempranas de la neurogénesis post-isquemia.

CONCLUSIÓN FINAL: Todos estos resultados, en conjunto, sugieren que la modulación de los niveles de glutamato a través de las alteraciones en la expresión de VGLUTs y EAATs, modulan el proceso de neurogénesis de la SVZ tras la isquemia y así, probablemente, la recuperación del tejido lesionado. Por tanto, pensamos que los VGLUTs, además de los EAATs, pueden ser considerados como diana terapéutica de neuroprotección y neurorreparación en la isquemia cerebral.

VII. Bibliografía

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Aarts MM, Tymianski M (2004) Molecular mechanisms underlying specificity of excitotoxic signaling in neurons. *Curr Mol Med* 4:137-147.
- Abrous DN, Koehl M, Le Moal M (2005) Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. *Physiol Rev* 85:523-569.
- Adhami F, Schloemer A, Kuan CY (2007) The roles of autophagy in cerebral ischemia. *Autophagy* 3:42-44.
- Agasse F, Roger M, Coronas V (2004) Neurogenic and intact or apoptotic non-neurogenic areas of adult brain release diffusible molecules that differentially modulate the development of subventricular zone cell cultures. *Eur J Neurosci* 19:1459-1468.
- Agasse F, Bernardino L, J M (2007) SVZ cells as a tool for brain repair. In: *Interaction between neurons and glia in aging and disease*. Eds Malva JO, Rego AC, Cunha RA and Oliveira CR Springer, New York, ISBN 978-0-387-70829-4.
- Agasse F, Bernardino L, Kristiansen H, Christiansen SH, Ferreira R, Silva B, Grade S, Woldbye DP, Malva JO (2008) Neuropeptide Y promotes neurogenesis in murine subventricular zone. *Stem Cells* 26:1636-1645.
- Agasse F BLaMJ (2007) SVZ cells as a tool for brain repair. In: *Interaction between neurons and glia in aging and disease*. Eds Malva JO, Rego AC, Cunha RA and Oliveira CR Springer, New York, ISBN 978-0-387-70829-4.
- Alcazar A, Martin de la Vega C, Bazan E, Fando JL, Salinas M (1997) Calcium mobilization by ryanodine promotes the phosphorylation of initiation factor 2alpha subunit and inhibits protein synthesis in cultured neurons. *J Neurochem* 69:1703-1708.
- Allen NJ, Karadottir R, Attwell D (2005) A preferential role for glycolysis in preventing the anoxic depolarization of rat hippocampal area CA1 pyramidal cells. *J Neurosci* 25:848-859.
- Arranz AM, Gottlieb M, Perez-Cerda F, Matute C (2009) Increased expression of glutamate transporters in subcortical white matter after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 37:156-165.
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8:963-970.
- Bagley JA, Belluscio L (2010) Dynamic imaging reveals that brain-derived neurotrophic factor can independently regulate motility and direction of neuroblasts within the rostral migratory stream. *Neuroscience* 169:1449-1461.
- Banasr M, Hery M, Printemps R, Daszuta A (2004) Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology* 29:450-460.
- Bath KG, Lee FS (2010) Neurotrophic factor control of adult SVZ neurogenesis. *Dev Neurobiol* 70:339-349.
- Beart PM, O'Shea RD (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol* 150:5-17.
- Bellocchio EEH, H. Pohorille, A. Chan, J. Pickel, V. M. Edwards, R. H. (1998) The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J Neurosci* 18:8648-8659.

- Bernardino L, Agasse F, Silva B, Ferreira R, Grade S, Malva JO (2008) Tumor necrosis factor- α modulates survival, proliferation, and neuronal differentiation in neonatal subventricular zone cell cultures. *Stem Cells* 26:2361-2371.
- Beschorner R, Simon P, Schauer N, Mittelbronn M, Schluesener HJ, Trautmann K, Dietz K, Meyermann R (2007) Reactive astrocytes and activated microglial cells express EAAT1, but not EAAT2, reflecting a neuroprotective potential following ischaemia. *Histopathology* 50:897-910.
- Bird MK, Lawrence AJ (2009) The promiscuous mGlu5 receptor--a range of partners for therapeutic possibilities? *Trends Pharmacol Sci* 30:617-623.
- Bushong EA, Martone ME, Jones YZ, Ellisman MH (2002) Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci* 22:183-192.
- Cali C, Marchaland J, Regazzi R, Bezzi P (2008) SDF 1- α (CXCL12) triggers glutamate exocytosis from astrocytes on a millisecond time scale: imaging analysis at the single-vesicle level with TIRF microscopy. *J Neuroimmunol* 198:82-91.
- Camacho AM, L. (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 37:11-18.
- Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrera P, Castillo J (2011a) Oxaloacetate: A novel neuroprotective for acute ischemic stroke. *The international journal of biochemistry and cell biology*.
- Campos F, Sobrino T, Ramos-Cabrera P, Castellanos M, Blanco M, Rodriguez-Yanez M, Serena J, Leira R, Castillo J (2011b) High blood glutamate oxaloacetate transaminase levels are associated with good functional outcome in acute ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:1387-1393.
- Castellanos M, Sobrino T, Pedraza S, Moldes O, Pumar JM, Silva Y, Serena J, Garcia-Gil M, Castillo J, Davalos A (2008) High plasma glutamate concentrations are associated with infarct growth in acute ischemic stroke. *Neurology* 71:1862-1868.
- Castiglione M, Calafiore M, Costa L, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A (2008) Group I metabotropic glutamate receptors control proliferation, survival and differentiation of cultured neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of adult mice. *Neuropharmacology* 55:560-567.
- Castillo J, Alvarez-Sabin J, Davalos A, Diez-Tejedor E, Lizasoain I, Martinez-Vila E, Vivancos J, Zarranz JJ (2003) [Consensus review. Pharmacological neuroprotection in cerebral ischemia: is it still a therapeutic option?]. *Neurologia* 18:368-384.
- Ceballos A, Belinchon MM, Sanchez-Mendoza E, Grijota-Martinez C, Dumitrescu AM, Refetoff S, Morte B, Bernal J (2009) Importance of monocarboxylate transporter 8 for the blood-brain barrier-dependent availability of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology* 150:2491-2496.
- Centonze D, Rossi S, Tortiglione A, Picconi B, Prosperetti C, De Chiara V, Bernardi G, Calabresi P (2007) Synaptic plasticity during recovery from permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Neurobiol Dis* 27:44-53.
- Cimarosti H, Jones NM, O'Shea RD, Pow DV, Salbego C, Beart PM (2005) Hypoxic preconditioning in neonatal rat brain involves regulation of excitatory amino acid transporter 2 and estrogen receptor α . *Neurosci Lett* 385:52-57.

- Coronas V, Bantubungi K, Fombonne J, Krantic S, Schiffmann SN, Roger M (2004) Dopamine D3 receptor stimulation promotes the proliferation of cells derived from the post-natal subventricular zone. *J Neurochem* 91:1292-1301.
- Chang HC, Yang YR, Wang SG, Wang RY (2009) Effects of treadmill training on motor performance and extracellular glutamate level in striatum in rats with or without transient middle cerebral artery occlusion. *Behav Brain Res* 205:450-455.
- Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, Katakowski M, Lu M, Chopp M (2005) Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:281-290.
- Chen X, Tian Y, Yao L, Zhang J, Liu Y (2010) Hypoxia stimulates proliferation of rat neural stem cells with influence on the expression of cyclin D1 and c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway in vitro. *Neuroscience* 165:705-714.
- Daniels R, Miller B, DiAntonio A (2011) Increased vesicular glutamate transporter expression causes excitotoxic neurodegeneration. *Neurobiology of Disease*:415-420.
- Darsalia V, Allison SJ, Cusulin C, Monni E, Kuzdas D, Kallur T, Lindvall O, Kokaia Z (2005) Cell number and timing of transplantation determine survival of human neural stem cell grafts in stroke-damaged rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 31:235-242.
- Di Filippo M, Tozzi A, Costa C, Belcastro V, Tantucci M, Picconi B, Calabresi P (2008) Plasticity and repair in the post-ischemic brain. *Neuropharmacology* 55:353-362.
- Di Giorgi-Gerevini V, Melchiorri D, Battaglia G, Ricci-Vitiani L, Ciceroni C, Busceti CL, Biagioni F, Iacovelli L, Canudas AM, Parati E, De Maria R, Nicoletti F (2005) Endogenous activation of metabotropic glutamate receptors supports the proliferation and survival of neural progenitor cells. *Cell Death Differ* 12:1124-1133.
- El Mestikawy S, Wallen-Mackenzie A, Fortin GM, Descarries L, Trudeau LE (2011) From glutamate co-release to vesicular synergy: vesicular glutamate transporters. *Nat Rev Neurosci* 12:204-216.
- Emerich DF, Dean RL, 3rd, Bartus RT (2002) The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol* 173:168-181.
- Fernandez-Gomez FJ, Hernandez FA, L. Galindo, M.F. Segura, T. Jordan, J. (2008) Farmacología de la neuroprotección en el ictus isquémico agudo. *Revista de Neurología* 47:253-260.
- Ferrer I, Krupinski J, Goutan E, Marti E, Ambrosio S, Arenas E (2001) Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neuropathol* 101:229-238.
- Fujiyama F, Furuta T, Kaneko T (2001) Immunocytochemical localization of candidates for vesicular glutamate transporters in the rat cerebral cortex. *J Comp Neurol* 435:379-387.
- Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A (1998) Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 36:234-248.
- Gottlieb M, Domercq M, Matute C (2000) Altered expression of the glutamate transporter EAAC1 in neurons and immature oligodendrocytes after transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:678-687.

- Gu W, Gu C, Jiang W, Wester P (2009) Neurotransmitter synthesis in poststroke cortical neurogenesis in adult rats. *Stem Cell Res* 4:148-154.
- Harms KM, Li L, Cunningham LA (2010) Murine neural stem/progenitor cells protect neurons against ischemia by HIF-1 α -regulated VEGF signaling. *PLoS One* 5:e9767.
- Hassel B, Dingledine R (2006) Glutamate. *Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical aspects*:267-290.
- Hayashi T, Abe K, Suzuki H, Itoyama Y (1997) Rapid induction of vascular endothelial growth factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28:2039-2044.
- Hazell AS (2007) Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and treatment strategies. *Neurochem Int* 50:941-953.
- Hertz L, Yu AC, Schousboe A (1992) Uptake and metabolism of malate in neurons and astrocytes in primary cultures. *J Neurosci Res* 33:289-296.
- Herzog E, Gilchrist J, Gras C, Muzerelle A, Ravassard P, Giros B, Gaspar P, El Mestikawy S (2004) Localization of VGLUT3, the vesicular glutamate transporter type 3, in the rat brain. *Neuroscience* 123:983-1002.
- Herzog ET, S. Jahn, R. Brose, N. Wojcik, S. M. (2006) Synaptic and vesicular co-localization of the glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in the mouse hippocampus. *J Neurochem* 99:1011-1018.
- Hollmann M, Heinemann S (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17:31-108.
- Hollmann M, S. H (1994) Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci* 17 31-108.
- Hossmann KA (2006) Pathophysiology and therapy of experimental stroke. *Cell Mol Neurobiol* 26:1057-1083.
- Ishibashi S, Sakaguchi M, Kuroiwa T, Yamasaki M, Kanemura Y, Shizuko I, Shimazaki T, Onodera M, Okano H, Mizusawa H (2004) Human neural stem/progenitor cells, expanded in long-term neurosphere culture, promote functional recovery after focal ischemia in Mongolian gerbils. *J Neurosci Res* 78:215-223.
- Jean YY, Lercher LD, Dreyfus CF (2008) Glutamate elicits release of BDNF from basal forebrain astrocytes in a process dependent on metabotropic receptors and the PLC pathway. *Neuron Glia Biol* 4:35-42.
- Jennifer M. Plane, Anuska V. Anjelkovic, Richard F. Keep, Parent. JM (2010) Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiology of Disease* 37:218-227.
- Kaneko N, Marin O, Koike M, Hirota Y, Uchiyama Y, Wu JY, Lu Q, Tessier-Lavigne M, Alvarez-Buylla A, Okano H, Rubenstein JL, Sawamoto K (2010) New neurons clear the path of astrocytic processes for their rapid migration in the adult brain. *Neuron* 67:213-223.
- Kashani A, Betancur C, Giros B, Hirsch E, El Mestikawy S (2007) Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease. *Neurobiol Aging* 28:568-578.
- Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Jung JY, Won MH, Choi SY, Kwon OS, Kang TC (2006) Transient ischaemia affects plasma membrane glutamate transporter, not vesicular glutamate transporter, expressions in the gerbil hippocampus. *Anat Histo Embryol* 35:265-270.

- Kim Y, Wang WZ, Comte I, Pastrana E, Tran PB, Brown J, Miller RJ, Doetsch F, Molnar Z, Szele FG (2010a) Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *J Neurochem*.
- Kim Y, Wang WZ, Comte I, Pastrana E, Tran PB, Brown J, Miller RJ, Doetsch F, Molnar Z, Szele FG (2010b) Dopamine stimulation of postnatal murine subventricular zone neurogenesis via the D3 receptor. *J Neurochem* 114:750-760.
- Komitova M, Perfilieva E, Mattsson B, Eriksson PS, Johansson BB (2006) Enriched environment after focal cortical ischemia enhances the generation of astroglia and NG2 positive polydendrocytes in adult rat neocortex. *Exp Neurol* 199:113-121.
- Lai AY, Todd KG (2006) Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions. *Can J Physiol Pharmacol* 84:49-59.
- Lai B, Mao XO, Xie L, Jin K, Greenberg DA (2008) Electrophysiological neurodifferentiation of subventricular zone-derived precursor cells following stroke. *Neurosci Lett* 442:305-308.
- Leasure JL, Grider M (2010) The effect of mild post-stroke exercise on reactive neurogenesis and recovery of somatosensation in aged rats. *Exp Neurol*.
- Leker RR, Lasri V, Chernoguz D (2009) Growth factors improve neurogenesis and outcome after focal cerebral ischemia. *J Neural Transm* 116:1397-1402.
- Lepore AC, Rauck B, Dejea C, Pardo AC, Rao MS, Rothstein JD, Maragakis NJ (2008) Focal transplantation-based astrocyte replacement is neuroprotective in a model of motor neuron disease. *Nat Neurosci* 11:1294-1301.
- Li Q, Lau A, Morris TJ, Guo L, Fordyce CB, Stanley EF (2004) A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci* 24:4070-4081.
- Li WL, Yu SP, Ogle ME, Ding XS, Wei L (2008) Enhanced neurogenesis and cell migration following focal ischemia and peripheral stimulation in mice. *Dev Neurobiol* 68:1474-1486.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, R. C (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke* Jan;20 84-91.
- Madri JA (2009) Modeling the neurovascular niche: implications for recovery from CNS injury. *J Physiol Pharmacol* 60 Suppl 4:95-104.
- Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA, Davalos A (2006) A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med* 203:711-717.
- Mattson MP (2008) Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. *Ann N Y Acad Sci* 1144:97-112.
- McLennan H (1976.) The autoradiographic localization of L-[3h]glutamate in rat brain tissue. *Brain Res* (1):139-144.
- Medina-Ceja L, Guerrero-Cazares H, Canales-Aguirre A, Morales-Villagran A, Feria-Velasco A (2007) [Structural and functional characteristics of glutamate transporters: how they are related to epilepsy and oxidative stress]. *Rev Neurol* 45:341-352.
- Moechars DW, M. C. Leo, S. Callaerts-Vegh, Z. Goris, I. Daneels, G. Buist, A. Cik, M. van der Spek, P. Kass, S. Meert, T. D'Hooge, R. Rosenmund, C. Hampson, R.

- M. (2006) Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci* 26:12055-12066.
- Monaghan DT, Bridges RJ, CW. C (1989) The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system.
. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29:365-402.
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci* 24:2633-2642.
- Murata Y, Higo N, Oishi T, Yamashita A, Matsuda K, Hayashi M, Yamane S (2008) Effects of motor training on the recovery of manual dexterity after primary motor cortex lesion in macaque monkeys. *J Neurophysiol* 99:773-786.
- Nakamichi N, Takarada T, Yoneda Y (2009) Neurogenesis mediated by gamma-aminobutyric acid and glutamate signaling. *J Pharmacol Sci* 110:133-149.
- Ni BR, P. R., Jr. Nadi, N. S. Paul, S. M. (1994) Cloning and expression of a cDNA encoding a brain-specific Na(+)-dependent inorganic phosphate cotransporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5607-5611.
- Ni Y, Parpura V (2009) Dual regulation of Ca(2+)-dependent glutamate release from astrocytes: Vesicular glutamate transporters and cytosolic glutamate levels. *Glia*.
- Nicholls DG (2004) Mitochondrial dysfunction and glutamate excitotoxicity studied in primary neuronal cultures. *Curr Mol Med* 4:149-177.
- Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* 26:13007-13016.
- Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y (2011) Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* 50:5558-5565.
- Ottersen OP, Zhang N, F. W (1992) Metabolic compartmentation of glutamate and glutamine: morphological evidence obtained by quantitative immunocytochemistry in rat cerebellum. *Neuroscience* 46:519-534.
- Perea G, Araque A (2007) Astrocytes potentiate transmitter release at single hippocampal synapses. *Science* 317:1083-1086.
- Perea G, Navarrete M, Araque A (2009) Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci* 32:421-431.
- Plane J, Anjelkovic A, Keep R, Parent J (2010) Intact and injured endothelial cells differentially modulate postnatal murine forebrain neural stem cells. *Neurobiology of Disease* 37:218-227.
- Platel JC, Lacar B, Bordey A (2007) GABA and glutamate signaling: homeostatic control of adult forebrain neurogenesis. *J Mol Histol* 38:602-610.
- Platel JC, Dave KA, Bordey A (2008a) Control of neuroblast production and migration by converging GABA and glutamate signals in the postnatal forebrain. *J Physiol* 586:3739-3743.
- Platel JC, Stamboulian S, Nguyen I, Bordey A (2010a) Neurotransmitter signaling in postnatal neurogenesis: The first leg. *Brain Res Rev* 63:60-71.
- Platel JC, Heintz T, Young S, Gordon V, Bordey A (2008b) Tonic activation of GLUK5 kainate receptors decreases neuroblast migration in whole-mounts of the subventricular zone. *J Physiol* 586:3783-3793.
- Platel JC, Dave KA, Gordon V, Lacar B, Rubio ME, Bordey A (2010b) NMDA receptors activated by subventricular zone astrocytic glutamate are critical for neuroblast survival prior to entering a synaptic network. *Neuron* 65:859-872.
- Pradillo JM, Hurtado O, Romera C, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Alonso-Escolano D, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2006) TNFR1 mediates increased

- neuronal membrane EAAT3 expression after in vivo cerebral ischemic preconditioning. *Neuroscience* 138:1171-1178.
- Prieto-Arribas R, Moreno-Gutierrez A, Simal-Hernandez P, Pascual-Garvi JM, Matias-Guiu J, Roda JM, Barcia-Albacar JA (2008) [Experimental models of cerebral ischemia]. *Rev Neurol* 47:414-426.
- Qin Shen, Susan K. Goderie, Li Jin, Nithin Karanth, Yu Sun, Natalia Abramova, Peter Vincent, Kevin Pumiglia, Temple. S (2004) Endothelial Cells Stimulate Self-Renewal And Expand Neurogenesis of Neural Stem Cells *Science* 304:1338-1340.
- Qu Q, Shi Y (2009) Neural stem cells in the developing and adult brains. *J Cell Physiol* 221:5-9.
- Quinones-Hinajosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, Romero-Rodriguez R, Berger MS, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (2006) Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol* 494:415-434.
- Rao VL, Bowen KK, Dempsey RJ (2001a) Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT-1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res* 26:497-502.
- Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ (2001b) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 21:1876-1883.
- Robin AM, Zhang ZG, Wang L, Zhang RL, Katakowski M, Zhang L, Wang Y, Zhang C, Chopp M (2006) Stromal cell-derived factor 1alpha mediates neural progenitor cell motility after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 26:125-134.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Rossini PM, Calautti C, Pauri F, Baron JC (2003) Post-stroke plastic reorganisation in the adult brain. *Lancet Neurol* 2:493-502.
- Saarelainen T, Lukkarinen JA, Koponen S, Grohn OH, Jolkkonen J, Koponen E, Haapasalo A, Alhonen L, Wong G, Koistinaho J, Kauppinen RA, Castren E (2000) Transgenic mice overexpressing truncated trkB neurotrophin receptors in neurons show increased susceptibility to cortical injury after focal cerebral ischemia. *Mol Cell Neurosci* 16:87-96.
- Sanchez-Mendoza E, Burguete MC, Castello-Ruiz M, Gonzalez MP, Roncero C, Salom JB, Arce C, Canadas S, Torregrosa G, Alborch E, Oset-Gasque MJ (2010) Transient focal cerebral ischemia significantly alters not only EAATs but also VGLUTs expression in rats: relevance of changes in reactive astroglia. *J Neurochem* 113:1343-1355.
- Santilli G, Lamorte G, Carlessi L, Ferrari D, Rota Nodari L, Binda E, Delia D, Vescovi AL, De Filippis L (2010) Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS One* 5:e8575.
- Schabitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke* 38:2165-2172.
- Schabitz WR, Berger C, Kollmar R, Seitz M, Tanay E, Kiessling M, Schwab S, Sommer C (2004) Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and

- forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke* 35:992-997.
- Segal M (1983) Rat hippocampal neurons in culture: responses to electrical and chemical stimuli. *J Neurophysiol* 50:1249-1264.
- Shigeri YS, R. P. Shimamoto, K. (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45:250-265.
- Sobrado M, Delgado M, Fernandez-Valle E, Garcia-Garcia L, Torres M, Sanchez-Prieto J, Vivancos J, Manzanares R, Moro MA, Pozo MA, Lizasoain I (2011) Longitudinal studies of ischemic penumbra by using 18F-FDG PET and MRI techniques in permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroimage* 57:45-54.
- Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119:7-35.
- Soumier A, Banasr M, Goff LK, Daszuta A (2010) Region- and phase-dependent effects of 5-HT(1A) and 5-HT(2C) receptor activation on adult neurogenesis. *Eur Neuropsychopharmacol* 20:336-345.
- Takamori S (2006) VGLUTs: 'exciting' times for glutamatergic research? *Neurosci Res* 55:343-351.
- Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A (2009) Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience* 158:301-308.
- Thored P, Wood J, Arvidsson A, Cammenga J, Kokaia Z, Lindvall O (2007) Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke. *Stroke* 38:3032-3039.
- Tordera RM, Pei Q, Sharp T (2005) Evidence for increased expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT1, by a course of antidepressant treatment. *J Neurochem* 94:875-883.
- Tzingounis AV, Wadiche JI (2007) Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* 8:935-947.
- Vemuganti R (2005) Decreased expression of vesicular GABA transporter, but not vesicular glutamate, acetylcholine and monoamine transporters in rat brain following focal ischemia. *Neurochem Int* 47:136-142.
- Wang F, Liang Z, Hou Q, Xing S, Ling L, He M, Pei Z, Zeng J (2007) Nogo-A is involved in secondary axonal degeneration of thalamus in hypertensive rats with focal cortical infarction. *Neurosci Lett* 417:255-260.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35:1732-1737.
- Wang YQ, Cui HR, Yang SZ, Sun HP, Qiu MH, Feng XY, Sun FY (2009) VEGF enhance cortical newborn neurons and their neurite development in adult rat brain after cerebral ischemia. *Neurochem Int* 55:629-636.
- Wilson NR, Kang J, Hueske EV, Leung T, Varoqui H, Murnick JG, Erickson JD, Liu G (2005) Presynaptic regulation of quantal size by the vesicular glutamate transporter VGLUT1. *J Neurosci* 25:6221-6234.
- Wisden W, Seeburg PH (1993) A complex mosaic of high-affinity kainate receptors in rat brain. *J Neurosci* 13:3582-3598.
- Wootz H, Enjin A, Wallen-Mackenzie A, Lindholm D, Kullander K (2010) Reduced VGLUT2 expression increases motor neuron viability in Sod1(G93A) mice. *Neurobiol Dis* 37:58-66.

- Yang JL, Sykora P, Wilson DM, 3rd, Mattson MP, Bohr VA (2011) The excitatory neurotransmitter glutamate stimulates DNA repair to increase neuronal resiliency. *Mech Ageing Dev.*
- Zachrisson O, Zhao M, Andersson A, Dannaeus K, Häggblad J, Isacson R, Nielsen E, Patrone C, Rönholm H, Wikstrom L, Delfani K, McCormack A, Palmer T, Di Monte D, Hill M, Janson A, Haegerstrand A (2011) Restorative effects of Platelet Derived Growth Factor-BB in Rodent Models of Parkinson's Disease. *Journal of Parkinson's Disease* 1:49-63.
- Zhang RL, Zhang ZG, Chopp M (2008) Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology* 55:345-352.
- Zhang RL, Chopp M, Gregg SR, Toh Y, Roberts C, Letourneau Y, Buller B, Jia L, S PND, Zhang ZG (2009) Patterns and dynamics of subventricular zone neuroblast migration in the ischemic striatum of the adult mouse. *J Cereb Blood Flow Metab* 29:1240-1250.